UNTERSUCHUNGEN ZUR LICHTABHÄNGIGEN ANTHOCYANSYNTHESE IN FAGOPYRUM ESCULENTUM MOENCH

von
Helmut Scherf
München
1967

Untersuchungen zur lichtabhängigen Anthocyansynthese in Fagopyrum esculentum Moench.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Helmut Scherf
aus
München

Juli 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1.Berichterstatter: Priv.Doz.Dr.M.H.Zenk
2.Berichterstatter: Prof.Dr.L.Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 7. 1967

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, München 22, Bruderstraße 9

Inhaltsverzeichnis

Seite :

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL und METHODEN 3

1. Pflanzenmaterial 3
2. Bestrahlungsanlagen 3
3. Messung der Lichtintensität 5
4. Extraktion der Pigmente des Buchweizens 5
5. Bestimmung des Malonyl-CoA-pools in vivo 7
6. Bestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase ... 8
7. Inkubationen 1o
8. Messung der Radioaktivität 11
9. Chemikalien 11

III. ERGEBNISSE 12

A. Isolierung und Identifizierung der im Buchweizen vorkommenden Pigmente 12

1. Anthocyane 12
2. Leucoanthocyan 14
3. Rutin 15
4. Chlorogensäure 17

B. Der Einfluß des Lichtes auf die Synthese der Pigmente 18

1. Kinetik der lichtabhängigen Synthese von Anthocyan, Rutin, Leucocyanidin und Chlorogensäure 18

1.1. Anthocyan 18
1.2. Rutin, Leucocyanidin und Chlorogensäure.. 22

Seite :

2. Kontrolle der über die Hochenergiereaktion induzierten Pigmentsynthese durch das Phytochromsystem 25

C. Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Vorstufen des A-Rings 34

1. Nachweis der Änderung des Malonyl-CoA-pools durch Bestimmung des Malonyl-Tryptophan-Gehalts der Pflanzen 34

1.1. Identifizierung des D-Tryptophan-Stoffwechselprodukts der höheren Pflanzen 35

1.2. Bestimmung der Konfiguration des Malonyl-Tryptophans 36

1.3. Die Verbreitung des Malonyl-D-Tryptophan-Konjugationsmechanismus im Pflanzenreich.. 38

2. Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Synthese von Malonyl-D-Tryptophan..... 41

2.1. Der Einfluß der Tryptophan-Konzentration auf die Aufnahme durch Buchweizenkeimlinge 41

2.2. Aufnahme von D-Tryptophan durch belichtete und unbelichtete Pflanzen 42

2.3. Die Umsatzgeschwindigkeit von D-Tryptophan in belichteten und unbelichteten Keimlingen 42

3. Die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase in belichteten und unbelichteten Pflanzen 44

D. Der Einfluß des Lichtes auf die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in Buchweizenkeimlingen.. 45

1. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase in unbelichteten und mit Weißlicht belichteten Buchweizenkeimlingen 45

1.1. Kinetik der Zunahme der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität bei Belichtung .. 46

1.2. Die Abhängigkeit der Phenylalanin-Ammonium-Lyase von der Beleuchtungsstärke 48

Seite :

1.3. Der Einfluß von Proteinhemmstoffen auf die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase 49

2. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in Hellrot und Dunkelrot belichteten Buchweizenkeimlingen 53

3. Der Einfluß des Phytochromsystems auf die durch Weißlicht induzierte Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität 55

IV. DISKUSSION 56

V. ZUSAMMENFASSUNG 61

VI. LITERATURVERZEICHNIS 65

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen benützt :

Phenylalanin-Ammonium-Lyase	= PAL;
Coenzym A	= CoA;
Hellrot	= HR;
Dunkelrot	= DR;
Tryptophan	= Try.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546005_0004

I. E I N L E I T U N G

Seit den Untersuchungen von BATALIN (1879), KUILMAN (1930) und KARSTENS (1939) ist bekannt, daß Licht die Synthese von flavonoiden Verbindungen in Buchweizenkeimlingen induziert.

Prinzipiell kann bei der lichtabhängigen Pigmentsynthese in höheren Pflanzen die Induktion über das Phytochromsystem oder über die blaulichtabhängige Hochenergiereaktion erfolgen (HENDRICKS und BORTHWICK, 1965; REINERT et al., 1964); es können auch beide Systeme gleichzeitig an der Farbstoffinduktion beteiligt sein (VINCE und GRILL, 1966). Interessanterweise kann die biochemische Manifestierung der blaulichtabhängigen Hochenergiereaktion durch das Phytochromsystem kontrolliert werden (DOWNS und SIEGELMAN, 1963). Für die Auslösung der Anthocyan- und Flavonolsynthese beim Buchweizen wurde der Nachweis erbracht, daß beide photoreaktive Systeme: Hochenergie- und Phytochromreaktion beteiligt sind (MOHR und v.NES, 1963; HARRASCHAIN und MOHR, 1963).

Die Biosynthese flavonoider Verbindungen erfolgt sehr wahrscheinlich durch Kondensation von aktivierter Zimtsäure mit 3 Molekülen Malonyl-CoA unter Bildung einer C_{15}-Verbindung, möglicherweise eines Chalcons, das dann in mehreren Reaktionsschritten in die entsprechenden flavonoiden Substanzen überführt wird (vgl.GRISEBACH, 1965).

Als unmittelbare Lichtwirkung bei der Biosynthese der Flavonoide wurde von HARRASCHAIN und MOHR (1963) als Folge einer "fundamentalen Umsteuerung" eine vermehrte Anlieferung der Vorstufe des A-Ringes, von Malonyl-CoA, postuliert. Eine ähnliche Ansicht wird von HENDRICKS und BORTHWICK (1965)

vertreten, die in der Hochenergiereaktion ebenfalls die erhöhte Produktion von Acylgruppen für den A-Ring flavonoider Verbindungen sehen; auch KANDELER (1960, 1964) interpretiert die Lichtwirkung in dieser Weise. Bei dieser Hypothese, zu deren Stützung stets die Befunde an der Mahler'schen Buturyldehydrogenase (MAHLER, 1954) herangezogen werden (z.B.MOHR und v.NES, 1963; SIEGELMAN, 1964; MOHR, 1964), wird eine allosterische Wirkung des Lichtes auf ein am Acetat- oder Malonat-Durchsatz beteiligtes Enzym oder Enzymsystem angenommen.

Eine völlig andere Vorstellung vertreten dagegen seit langem THIMANN und RADNER (1955, 1958, 1962). Sie postulieren, daß an der lichtinduzierten Anthocyansynthese das Nucleinsäuresystem sowie eine Protein-Neusynthese beteiligt seien. Ihre Auffassung wurde inzwischen vor allem von KLEIN und HAGEN (1961), MARGULIES (1962), HESS (1964), LANGE und MOHR (1965) und STAFFORD (1966) durch Untersuchungen mit Hemmstoffen belegt.

Unabhängig von den bei der Anthocyansynthese gefundenen Ergebnissen hat RILLING schon 1962 gesagt, daß das Licht in Mikroorganismen die Carotinoidsynthese über eine Protein-Neusynthese induziert; diese Ansicht konnte von RAU (1967b) bestätigt werden. ENGELSMA und MEIJER (1965), sowie ENGELSMA (1965, 1966) konnten außerdem eindeutig zeigen, daß Blaulicht in einer Hochenergiereaktion Zimtsäurehydroxylasen in Gurkenkeimlingen de novo induziert, was zur Akkumulierung von p-Cumarsäure im Gewebe führt; ein direkter Nachweis der Neubildung dieser Enzyme steht aber noch aus. Den wichtigsten Befund in diesem Zusammenhang hat jedoch ZUCKER (1963, 1965) erbracht, der bei der lichtabhängigen Chlorogensäure-Biosynthese in Kartoffelzylindern fand, daß weißes Licht eine drastische Protein-Neusynthese bewirkt, und daß das erste Enzym im Phenylpropanstoffwechsel, die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (KOUKOL und CONN, 1961), die die Verteilung des L-Phenylalanins zwischen Protein und Phenolen steuert,

in ihrer Aktivität gegenüber der Dunkelkontrolle um das 3,5-fache steigt. ZUCKER (1963, 1965) hat somit als Erster den experimentellen Beweis erbracht, daß das Licht unabhängig von der Photosynthese über das Genom die Aktivität spezifischer Enzyme steigert, was dann zur Synthese und Akkumulation eines Stoffwechselproduktes führen kann. MOHR (1966) hat sich inzwischen dieser Auffassung angeschlossen und diesen Mechanismus auch für die Phytochromreaktion in Anspruch genommen.

Diese zwei konträren Auffassungen über den Mechanismus der lichtabhängigen Synthese flavonoider Verbindungen sollten nun an Buchweizenkeimlingen, Fagopyrum esculentum Moench, geprüft werden.

II. M A T E R I A L und M E T H O D E N

1. Pflanzenmaterial

Die Buchweizenfrüchte, Südafrikanischer Provenienz, wurden von der Firma Samen-Schmitz, München, bezogen.

Ausgesät wurde in 3o × 22 × 4,5 cm großen emaillierten Schalen, deren Boden mit 6oo cm^3 Vermiculite Nr. 3, befeuchtet mit 3oo cm^3 Wasser, gleichmäßig bedeckt war. Die bei 2o°C im Dunkelschrank gezogenen Keimlinge wurden 138 Stdn. nach der Aussaat verwendet. Die Hypokotyllänge betrug zu diesem Zeitpunkt rund 6 cm.

Bei einigen Versuchen wurde die von MOHR und v.NES (1963) angegebene Anzucht in Kunststoffdosen durchgeführt.

2. Bestrahlungsanlagen

Zur Weißlicht-Bestrahlung wurden Osram-Glühlampen verschiedener Watt-Leistung verwendet. Zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur von 25-27°C, auch bei Bestrahlung mit Glühbirnen

hoher Watt-Leistung, wurde zwischen der Lampe und den Versuchspflanzen eine Glasplatte angebracht, getragen von einem 6 cm hohen Winkelrahmen, über die zur Kühlung Wasser geleitet wurde. Die Stärke der Wasserschicht auf der Platte betrug 2 cm. Die ganze Anlage wurde in einer Klimakammer installiert, wodurch eine weitere Möglichkeit der Temperaturregelung gegeben war.

Für Hellrot-Bestrahlungen wurde in Anlehnung an Angaben von MOHR und PINNING (1962) ein Aggregat mit zehn 48 cm langen roten Leuchtstoffröhren (Philips TL 2o W/15) und einem 2 mm dicken roten Plexiglas Nr. 5o1 der Firma Röhm und Haas, Darmstadt, verwendet (Lichtintensität ca. 4 5oo erg/cm^2.sec).

Das Dunkelrot-Feld wurde mit einer Attralux-Reflektorlampe (Philips 3oo W, 22o V), die durch Wasser gekühlt wurde, und einem 2 mm starken roten und einem 3 mm starken blauen Plexiglas Nr. 5o1 beziehungsweise Nr. 627 der Firma Röhm und Haas nach der Anordnung von MOHR und SCHOSER (1959) und MOHR und v.NES (1963) hergestellt (Lichtintensität ca. 4 ooo erg/cm^2.sec).

Die Blaulicht-Bestrahlungsanlage wurde nach Angaben von REINERT et al. (1964) hergestellt; sie bestand aus zehn blauen Leuchtstoffröhren (Philips TL 2o W/18), einem 3 mm starken blauen Plexiglas Nr. 627 der Firma Röhm und Haas und einem $CuSO_4$-Filter ($CuSO_4$-Lösung, 5o g/Liter, 7 cm Schichtdicke). Die Lichtintensität dieser Anlage betrug rund 3 5oo erg/cm^2.sec.

Bei Versuchen mit der Lichtwarburgapparatur wurden zur Weißlicht-Bestrahlung entweder acht 48 cm lange Leuchtstoffröhren (Philips TL 2o W/33) oder 6 Philips Attralux-Reflektorlampen 15o W, zur Hellrot-Bestrahlung rote Leuchtstoffröhren und rotes Plexiglas, wie bei dem beschriebenen Hellrot-Aggregat, verwendet.

3. Messung der Lichtintensität

Angaben über die Intensität des Hellrot- und des Dunkelrot-Feldes resultieren aus Messungen mit einem Multiflex-Galvanometer Type MGF 0 (Original Dr.B.Lange) mit Thermosäule, Type E 1, Kipp, Delft/Holland.

Die Intensität der Weißlicht-Strahlung wurde mit einem Luxmeter festgestellt.

4. Extraktion der Pigmente des Buchweizens

Zur Induktion der Pigmentsynthesen wurden die ganzen Pflanzen bestrahlt, die Extraktion der Pigmente erfolgte nur aus den Hypokotylen. Zur Extraktion der Gesamt-Anthocyane wurden jeweils 2o Hypokotyle in 1oo ml Plastikbechern mit Schraubverschluß mit 1o ml 1 n HCl und 15 g Glasperlen - 4 mm Ø - 45 Min. auf einer Schüttelmaschine geschüttelt (vgl.RAU, 1967a). Die Frequenz der Maschine betrug 15o Schwingungen pro Min. 45 Minuten Schütteln genügten, um die Pflanzen zu einer homogenen Masse zu zerschlagen, die anschließend bei 8ooo×g 4o Min. klarzentrifugiert wurde. Der klare Überstand wurde bei 515 nm im Beckman-Spektralphotometer Modell B gegen 1 n HCl gemessen. Im Gegensatz zu der Auffassung von MOHR und v.NES (1963) liegen in Dunkelkeimlingen von Fagopyrum keine Anthocyane vor. Selbst bei Aufarbeitung großer Mengen etiolierter Keimlinge gelang es uns nicht, dünnschicht- oder papierchromatographisch Anthocyane nachzuweisen. Der von den oben genannten Autoren gefundene Dunkelwert ist auf die Lichtstreuung der Extrakte bei 515 nm zurückzuführen. Die Lichtstreuung bei dieser Wellenlänge wurde von uns dadurch bestimmt, daß dem Extrakt (5 ml, 1 n HCl) o,1 ml 3o % H_2O_2 zugesetzt wurde. Nach 8o Min. (Abb. 1) war das Anthocyan quantitativ zu farblosen Produkten oxydiert; die auf der Lichtstreuung basierende Extinktion der Probe bei 515 nm wurde von den Cyanidin-Werten abgezogen.

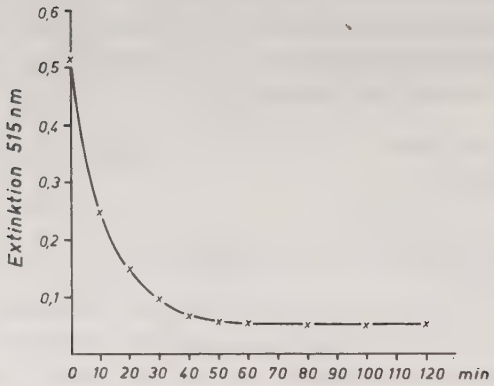


Abb.1: Kinetik der oxydativen Zerstörung der Anthocyane in 1 n HCl durch H_2O_2.

Nach Angaben von STAFFORD (1966) hat Cyanidin in diesem Wellenlängenbereich einen Absorptionskoeffizienten von 24 500. Cyanidinglucoside besitzen aber meist einen etwas niedereren Absorptionskoeffizienten (I.B.HARBORNE; T.SWAIN, persönliche Mitteilung). Die quantitativen Angaben über den Cyanidingehalt der Keimlinge sind daher als Minimalwerte aufzufassen.

Die Flavonole der Kotyledonen wurden nach der Methode von HARRASCHAIN und MOHR (1963) in heißem Methanol extrahiert. Die Absorption der Extrakte bei 343 nm diente als relatives Maß der Flavonsynthese. Die Messung wurde im Beckman-Spektralphotometer B oder DB durchgeführt.

Auf die Extraktion weiterer im Buchweizen enthaltener Pigmente wird in Kapitel III A eingegangen.

5. Bestimmung des Malonyl-CoA-pools in vivo

Inkubiert man höhere Pflanzen mit DL-Tryptophan, so wird das D-Isomere der Aminosäure malonyliert, es entsteht Malonyl-D-Tryptophan (ZENK und SCHERF, 1963). Analog der Reaktion bei Pilzen, bei der das D-Isomere acetyliert wird, wobei Acetyl-CoA als Acyldonator dient (ZENK und SCHMITT, 1965) ist bei höheren Pflanzen Malonyl-CoA der Acyldonator (ZENK, 1966).

Eine Änderung des Malonyl-CoA-pools der Pflanzen muß sich auf die Synthese von Malonyl-D-Tryptophan auswirken: es ist zu erwarten, daß bei einer Erhöhung des Malonyl-CoA-pools, auch bei nicht sättigender Konzentration von D-Tryptophan, die Synthese von Malonyl-D-Tryptophan steigt, da ja die Durchsatzgeschwindigkeit der N-Acylase unter diesen Bedingungen nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

Zur Bestimmung des Malonyl-CoA-pools in vivo wurden Buchweizenkeimlinge mit D-Tryptophan-^{14}C inkubiert. Die Extraktion der Pflanzen erfolgte in heißem 80%igem Äthanol am Rückflußkühler. Der Extrakt wurde auf ein kleines Volumen eingeengt und zur Isolierung von Malonyl-D-Tryptophan-^{14}C und Tryptophan-^{14}C aufsteigend chromatographiert. Die zur Papier- und Dünnschichtchromatographie verwendeten Laufmittel und die Rf-Werte von Malonyl-D-Tryptophan und Tryptophan sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Menge des gebildeten Malonyl-D-Tryptophans wurde durch Messung der Radioaktivität und auf kolorimetrischem Weg mit p-Dimethylaminobenzaldehyd nach UDENFRIEND und PETERSON (1957) quantitativ bestimmt.

Die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase in Protein-Rohextrakten von Fagopyrum esculentum Moench, gewonnen aus Acetonpulver, wurde nach der Methode von MATSUHASHI et al. (1964) (Enzymtest D) bestimmt. Die spezifische Aktivität

von Extrakten aus belichteten und unbelichteten Pflanzen wurde verglichen. Das verwendete $^{14}CO_3^{-2}$ hatte eine spezifische Aktivität von o,4 mc/mMol; es wurden 3,4 mg Protein pro Test eingesetzt.

Laufmittel		Malonyl-D-Tryptophan	Tryptophan
a)	Isopropanol... 6 NH_3 ..... 1 H_2O 2	o,5o	o,66
	Butanol ..... 4 Eisessig ..... 1 H_2O 1	o,64	o,37
b)	Methylacetat.. 45* Isopropanol .. 35 25 % NH_3 ..... 2o	o,o5	o,2o
	Chloroform ... 35 Äthylacetat .. 55 HCOOH 1o	o,4o	o,o6
	Toluol ..... 5o* Äthylformiat.. 4o HCOOH 1o	o,3o	o,o6

*nach STAHL (1962)

Tab.1: Laufmittel und Rf-Werte für Malonyl-D-Tryptophan und Tryptophan.
a) Pypierchromatographie (Schleicher und Schüll-Papier 2o43b)
b) Dünnschichtchromatographie (Kieselgel GF-Platten)

6. Bestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase

Dieses von KOUKOL und CONN (1961) entdeckte Enzym, L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL; EC 4.3.1.5.), wurde in Pufferextrakten aus Acetonpulver bestimmt. Das Acetonpulver für einen Testansatz wurde jeweils aus 8o Hypokotylen, mit einem durchschnittlichen Frischgewicht von 8 g, hergestellt. Die Hypokotyle wurden mit 3oo ml, auf -15°C gekühltem Aceton,

2 Min. im Starmix zerkleinert. Das Homogenat wurde durch einen Büchner-Trichter filtriert, der Rückstand mit 1oo ml Aceton nachgewaschen und anschließend im Exsikkator über P_2O_5 und Paraffin 12 Stdn. bei -4°C getrocknet. Die Ausbeute an Acetonpulver betrug rund 15o mg. Die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase wurde spektrophotometrisch nach ZUCKER (1965) bestimmt. Zimtsäure, gelöst in o,1 m Boratpuffer, beginnt bei 3o8 nm Licht zu absorbieren und weist einen Absorptionsgipfel bei 268 nm auf, während L-Phenylalanin bei 285 nm Licht zu absorbieren beginnt und einen ersten Gipfel bei 265 nm zeigt (Abb. 2).

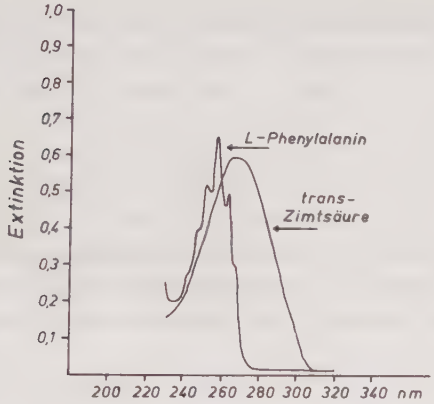


Abb.2:
Absorptionsspektren von L-Phenylalanin ($3,3 \cdot 1o^{-3}$m) und trans-Zimtsäure ($3,3 \cdot 1o^{-5}$m) in o,1 m Boratpuffer pH 8,8.

Die Extinktion von o,1 µMol Zimtsäure, gelöst in 3 ml o,1m Boratpuffer pH 8,8 beträgt bei 28o nm o,53o, bei 29o nm o,315. Für die Messung der durch enzymatische Deaminierung gebildeten Zimtsäure wurde der Zuwachs der Absorption bei 28o und 29o nm bestimmt. Der Quotient der bei diesen Wellenlängen gemessenen Extinktion beträgt 1,68. Dieser Quotient wurde routinemäßig bei der Messung der enzymatischen Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase bestimmt und dadurch die Natur des Enzymproduktes bestätigt. Für jeden Versuchsansatz

wurden 15o mg Acetonpulver mit 5 ml o,1 m Boratpuffer pH 8,8 extrahiert. Nach einstündigem Rühren bei 0°C wurde der Extrakt 15 Min. mit 39 ooo × g bei 4°C klarzentrifugiert.

In jeden Enzymtest wurden jeweils 1,5 mg Protein, 1o µMol L-Phenylalanin und 15o µMol Boratpuffer pH 8,8 eingesetzt. Der Ansatz wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 3 ml gebracht. Die Messung erfolgte im Zeiss schen Spektralphotometer PMQ II bei 4o°C über eine Stunde in Abständen von 1o Min. Als spezifische Aktivität des Enzyms wurde definiert: µMol Zimtsäure, gebildet pro mg Protein in 6o Min. bei 4o°C.

Der Proteingehalt des Enzymrohextraktes wurde nach LOWRY et al. (1951) bestimmt. Die Extrakte enthielten sowohl bei belichteten als auch bei unbelichteten Pflanzen im Durchschnitt 4 mg Protein pro ml.

7. Inkubationen

Inkubationen mit Hemmstoffen wurden in Petrischalen durchgeführt. Je nach der Menge des zu inkubierenden Materials wurden Glasschalen von 9 oder 13 cm Durchmesser verwendet.

Die Petrischalen wurden auf einer um die Mittelachse schwingende Schüttelmaschine geschüttelt, die unter die jeweilige Lichtquelle gestellt werden konnte. Im Gegensatz zu den herkömmlichen horizontal schwingenden Schüttelmaschinen wird bei der verwendeten Maschine gewährleistet, daß die Petrischalen ihre Lage unter der Lampe in der Horizontalen nicht verändern und ihr vertikaler Abstand von der Lichtquelle im Ganzen gesehen ebenfalls gleich bleibt, sodaß alle Petrischalen stets gleichen Lichtbedingungen ausgesetzt sind.

Die Inkubation von D-Tryptophan-^{14}C wurde in 25o ml Erlenmeyer-Kölbchen in einer Lichtwarburgapparatur vom Typ PL 85 der Firma Braun, Melsungen, durchgeführt. Inkubiert wurden

entweder ganze Keimlinge, Hypokotyle oder Kotyledonen. Die Inkubationslösung betrug 2o oder 5o ml.

8. Messung der Radioaktivität

Radioaktivitätsbestimmungen wurden mit Strahlungsmeßgeräten der Firma Frieseke und Hoepfner und mit einem Dünnschicht-Scanner der Firma Berthold durchgeführt.

Die zu messende Lösung wurde mit λ-Pipetten auf fettfreie Aluminiumplättchen aufgetragen. Ein auf das Plättchen aufgedrückter Silikonfettring verhinderte das Abfließen der Lösung. Die an der Luft oder unter einer Infrarotlampe schonend getrockneten Proben wurden anschließend im Methandurchflußzähler FH 4o7 in "unendlich dünner Schicht" gezählt.

Autoradiogramme wurden auf Agfa-Röntgenfilme gelegt. An Hand der nach 2-8 Wochen entwickelten Filme wurden die radioaktiven Stellen auf dem Chromatogramm genau lokalisiert und mit dem Endfensterzählrohr FH 4o7 ihre prozentuale Verteilung ermittelt.

Autoradiogramme wurden auch mit dem Dünnschicht-Scanner FB 272o der Firma Berthold, an den ein Linienschreiber angeschlossen war, ausgewertet.

9. Chemikalien

Die käuflich erworbenen Chemikalien waren von größtmöglicher Reinheit.

Bei der Synthese von Malonyl-Tryptophan über Malonsäurehalbchlorid wurde die Schotten-Baumann-Reaktion angewandt.

D-Tryptophan-^{14}C wurde nach der von SCHMITT und ZENK (1966) angegebenen Methode hergestellt.

Acetyl-Tryptophan wurde nach AUERBACH und KNOX (1957) synthetisiert.

III. E R G E B N I S S E

A. Isolierung und Identifizierung der im Buchweizen vorkommenden Pigmente

1. Anthocyane

Alle in Fagopyrum vorkommenden Anthocyane enthalten Cyanidin als Aglykon; dies wurde bereits von KARSTENS (1939) gefunden und von GRISEBACH und BOPP (1959) bestätigt. Die Natur der Glycosidkomponente der Anthocyane ist aber bisher noch nicht geklärt. Es wurde hier der Versuch unternommen, die Natur der in Buchweizen vorkommenden Cyanidinglycoside zu bestimmen.

Buchweizenkeimlinge wurden 12 Stdn. mit 25 ooo Lux Weißlicht bestrahlt, 12 Stdn. im Dunklen belassen und anschließend, nur die Hypokotyle, mit heißem 8o%igem Alkohol fixiert. Nach 24 Stdn. wurde der im Dunklen gehaltene Extrakt filtriert, am Rotationsverdampfer bis zur beginnenden Trockenheit eingedampft und der Rückstand mit 8o%igem Alkohol aufgenommen. Der unlösliche Rückstand wurde abgetrennt und der alkoholische Extrakt auf Dünnschichtplatten (Kieselgel G, 25o µ dick) aufgetragen und diese in dem für Anthocyan-Trennungen besonders geeigneten Laufmittel : Äthylacetat : Ameisensäure : H_2O = 7o:15:15 (HESS und MEYER, 1962) entwickelt.

Es wurden 3 Banden beobachtet. Eine sehr starke Bande A, Rf o,3o, eine schwache Bande B mit Rf o,41 und eine nur als Spur erkennbare Bande C mit Rf o,o8. Dies, nur in Spuren vorliegende Anthocyan C, konnte aus Mangel an Substanz nicht weiter analysiert werden. Möglicherweise handelt es sich hier um Cyanidin-Tri-Glucosid. Die Anthocyane A und B wurden mit methanolischer HCl (1 % konz. HCl) aus den entsprechenden Kieselgelzonen eluiert, das Eluationsvolumen eingeengt und der aufsteigenden Papierchromatographie unterworfen.

Es wurden folgende Laufmittel verwendet :

1. Butanol : 2 n HCl ..... = 4 : 6
2. Butanol : Eisessig : H_2O ..... = 4 : 1 : 5
3. Ameisensäure : HCl : H_2O ..... = 5 : 2 : 3
4. Isopropanol : 2 n HCl ..... = 1 : 1

In Tabelle 2 sind die Rf-Werte der Verbindung zusammengefaßt.

Anthocyan	Laufmittel 1	2	3	4
A	o,79	o,42	o,82	o,42
B	o,2o	o,31	o,69	o,3o
Cyanidin-3-glucosid	o,23	o,31	o,68	o,3o

Tab.2: Rf-Werte der isolierten Anthocyane in verschiedenen Laufmitteln.

Für Vergleichszwecke wurde uns Cyanidin-3-glucosid als Reinsubstanz aus einer genetisch einheitlichen Petunia-Rasse von Herrn Doz.Dr.D.Hess, Köln, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Anthocyan B war sowohl nach der Beurteilung der Rf-Werte, als auch durch Cochromatographie mit authentischem Cyanidin-3-glucosid in jedem Laufmittel identisch.

Anthocyan A wurde in mindestens drei der oben beschriebenen Laufmittel papierchromatographisch gereinigt und jeweils mit der wässrigen Phase des Gemisches Butanol : Eisessig : H_2O = 4:1:5 eluiert. Zuletzt wurde das reine Anthocyan auf gewaschenem Whatman-3-papier im Laufmittel 15 % Essigsäure chromatographiert. Die Anthocyanbande (Rf o,51) wurde eluiert, auf ein geringes Volumen eingedampft und nach HARBORNE (196o) hydrolysiert. Das Aglycon Cyanidin wurde mit Pentanol entfernt und die Wasserphase mit Di-n-oktylmethylamin in Chloro-

form entsäuert. Die wässrige Lösung wurde im Volumen eingeengt und aufsteigend im Laufmittel Butanol : Benzol : Pyridin : H_2O = 5:1:3:3 (HARBORNE, 1960) chromatographiert. Der Vergleich mit authentischen Zuckergemischen ergab, daß die Zuckerkomponente des Hauptanthocyans von Fagopyrum Rhamnose (Rf o,41), Glucose (Rf o,18) und Galaktose (Rf o,15) im ungefähren Verhältnis 1:1:1 enthält. Die Position der Zuckerreste am Anthocyanmolekül konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Ein Cyanidinglycosid mit dieser Zuckerkomponente wurde in der Natur bisher noch nicht gefunden.

Zur quantitativen Erfassung der verschiedenen Anthocyane wurden 2o etwa o,5 cm lange Hypokotyle 1 Min. in 1o ml siedendem Methanol mehrmals extrahiert, die vereinigten Extrakte auf 2,5 ml eingeengt und aliquote Teile dieser Lösung der Dünnschichtchromatographie unterworfen; die Banden wurden wie oben beschrieben eluiert, die Extinktion der Lösungen bei 515 nm gemessen und auf µMol Cyanidin umgerechnet. Der Verlust an Anthocyan betrug bei dieser Methode etwa 2o %.

2. Leucoanthocyan

Es ist bekannt, daß Leucoanthocyan in Buchweizen vorkommt (JONESCO, 193o; vgl. auch TROYER, 1964), man kennt jedoch noch nicht die Natur des Leucoanthocyan-aglycons. Der Leucoanthocyangehalt der Fagopyrumkeimlinge wurde nach GOVINDARAJAN und MATHEW (1965) bestimmt. 2o Hypokotyle wurden mit 8 ml n-Butanol-HCl (4o %) + 2 ml konzentrierter Eisensulfatlösung versetzt und 15 Min. bei 95°C im Wasserbad erhitzt. Die Lösung wurde nach dem Abkühlen filtriert und die Extinktion bei 555 nm gemessen. Diese heute wohl geeignetste Methode erfaßt zwar nur etwa 3o % des vorliegenden Leucoanthocyans, sie ist aber für biologische Proben durchaus anwendbar (CREASY und SWAIN, 1966) und liefert vergleichbare und reproduzierbare Werte. Bei Verwendung von belichteten, anthocyanhaltigen Pflanzen kann der Anthocyanwert bei 555 nm in Abzug gebracht werden, da die in Fagopyrum vorliegenden Anthocyane

ihre Farbintensität in dem Butanol/HCl-Reagens nicht verändern.

Die im sauren Milieu bedingte Umlagerung des Leucoanthocyanidins in Anthocyanidin erlaubt eine Aussage über das Vorliegen des Leucoanthocyanidin-aglycons. Der Butanolextrakt wurde daher eingeengt und das Konzentrat der papierchromatographischen Analyse unterworfen (Laufmittel: Ameisensäure : HCl : H_2O = 5:2:3). Es konnte als einziges Anthocyanidin Cyanidin (Rf o,34) festgestellt werden.

Somit dürfte bewiesen sein, daß es sich bei den vorliegenden Leucoanthocyanen um Leucocyanidinderivate handelt. Für die quantitativen Bestimmungen des Leucoanthocyangehaltes der Keimlinge konnte somit der molare Absorptionskoeffizient für Cyanidin zugrunde gelegt werden. Eine Korrektur der Werte auf den tatsächlichen Leucoanthocyangehalt der Pflanzen (siehe oben) konnte nicht durchgeführt werden, es muß jedoch damit gerechnet werden, daß mindestens loo % mehr Leucoanthocyan als angegeben vorliegt.

3. Rutin

Das Vorkommen von Rutin in Buchweizen ist seit langem bekannt (WUNDERLICH, 19o8). Neben dem Hauptflavonol Rutin liegen in der Fagopyrum-Pflanze aber auch noch weitere Flavonole vor, vornehmlich Quercitrin und Hyperosid, sowie ein oder zwei noch nicht charakterisierte Flavone (HÄNSEL und HÖRHAMMER, 1954). Die für diese Untersuchungen verwendeten Hypokotyle des Buchweizens sollen nach Untersuchung von TROYER (1955, 1956) lediglich Rutin, nicht aber die von ihm in Kotyledonen gefundenen Flavone oder Flavonole, die er mit A, B, C und D bezeichnete, enthalten.

Um diese Tatsache zu bestätigen, wurde mit dem Methanolextrakt der Hypokotyle eine dünnschichtchromatographische

Untersuchung auf Kieselgel GF_{254}-Schichten im Laufmittel Äthylacetat : Ameisensäure : H_2O = 7o:15:15 (HESS und MEYER, 1962) durchgeführt. Neben einer Zone (Rf o,41), die eindeutig durch Cochromatographie mit authentischem Rutin in sieben verschiedenen Laufmitteln (vgl. Tab.3) als Rutin identifiziert werden konnte, waren jedoch noch 3 weitere, sehr schwach gelb gefärbte Verbindungen sichtbar (Rf-Werte im obigen Laufmittel : o,83; o,74; o,65).

Laufmittel	Rf-Werte Quercetin	Quercitrin	Rutin	Hyperosid
Butanol:Eisessig:H_2O 4 : 1 : 5	o,68	o,75	o,45	o,62
Butanol : 2n HCl 4 : 6	o,93	o,93	o,77	o,88
Ameisensäure 5 %	o,o1	o,3o	o,35	o,18
Isopropanol : 2n HCl 1 : 1	o,71	o,99	o,93	o,93
Butanol:Eisessig:H_2O 2o : 1 : 4	o,64	o,66	o,29	o,49
Essigsäure:HCl:H_2O 3o : 3 : 1o	o,44	o,8o	o,78	o,77
Ameisensäure:HCl:H_2O 5 : 2 : 3	o,15	o,39	o,8o	o,7o

Tab.3: Laufmittel und Rf-Werte für Flavonole

Zwei dieser Verbindungen hatten ähnliches chromatographisches Verhalten wie Hyperosid und Quercitrin, zeigten aber nach papierchromatographischer Reinigung ein völlig anderes UV-Absorptionsspektrum wie die authentischen Substanzen.
(Herrn Prof.Dr.H.Wagner, München, sind wir für die Überlassung der Reinsubstanzen zu Dank verpflichtet.)

Diese hier beschriebenen unbekannt gebliebenen Substanzen nehmen zwar in ihrer Konzentration nach Belichtung der etiolierten Keimlinge auch zu, wurden aber bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Zur quantitativen Ermittlung des Rutingehaltes der Fagopyrum-Pflanzen wurden aliquote Teile des Methanolextraktes auf Kieselgel H-Platten aufgetragen und im Laufmittel Äthylacetat : Ameisensäure : H_2O = 7o:15:15 entwickelt. Die Rutin-Zone wurde mit Methanol quantitativ eluiert und die Absorption bei 35o nm ermittelt. An Hand einer Eichkurve konnte dann der Gehalt an Rutin errechnet werden (Rutin E = $1{,}624 \cdot 10^7$ cm^2/Mol). Die Ausbeute des Pigments nach diesem Verfahren betrug 82 %. Die Werte wurden auf 1oo % korrigiert.

4. Chlorogensäure

Chlorogensäure wurde erstmals von HÖRHAMMER und SCHERM (1955) in grünen Buchweizenpflanzen gefunden. Dabei wurde festgestellt, daß die Pflanzen nach einer Keimungsdauer von 7 Tagen weder Chlorogensäure noch Kaffeesäure enthielten, dafür aber geringe Mengen an Gallussäure und Protocatechusäure. Erst mit zunehmendem Alter der Pflanzen treten die anderen Säuren auf. In 6 Tage alten etiolierten Keimlingen von Fagopyrum konnten wir weder Kaffee-, noch Gallus-, noch Protocatechusäure nachweisen. Es trat aber bei der Dünnschichtchromatographie des Methanolextraktes der Keimlinge im oben erwähnten Laufmittel eine Substanz mit einem Rf-Wert von o,52 auf, die auf Papier im Laufmittel Butanol : 2 n HCl = 4:6 einen Rf-Wert von o,77 zeigte, im UV-Licht hellblau fluoreszierte und in beiden Laufmitteln einen mit Chlorogensäure identischen Rf-Wert zeigte. Die Substanz wurde nach dem zweiten Reinigungsschritt mit Methanol eluiert und zeigte eine völlige Übereinstimmung im UV-Spektrum mit authentischer Chlorogensäure (max: 328 nm, min: 268 nm, Schulter bei 3o7 nm).

Zur quantitativen Bestimmung der Chlorogensäure wurde die oben beschriebene zweistufige Reinigung angewendet und die

Konzentration der Säure in der methanolischen Lösung spektrophotometrisch bei 328 nm bestimmt (Chlorogensäure E = $1{,}463 \cdot 10^7$ cm^2/Mol). Die Ausbeute bei diesem Verfahren betrug 85 %; alle Werte wurden auf 100 % korrigiert.

B. Der Einfluß des Lichtes auf die Synthese der Pigmente

Obwohl an Buchweizen zahlreiche biochemische Untersuchungen zur Flavonoidsynthese durchgeführt wurden, liegen bisher noch keine oder nur ungenaue Angaben über den Verlauf und den Grad der lichtinduzierten Pigmentsynthese vor.

1. Kinetik der lichtabhängigen Synthese von Anthocyan, Rutin, Leucocyanidin und Chlorogensäure

1.1. Anthocyan

Dunkelkeimlinge von Fagopyrum enthalten keinerlei Cyanidinglycoside. Jedoch wird bereits durch relativ kurze Bestrahlung der Keimlinge mit Weißlicht hoher Lichtintensität (25 000 Lux) die Anthocyansynthese induziert (Abb.3). In den ersten 8 Stunden hängt das Ausmaß der Pigmentsynthese von der Bestrahlungsdauer ab. Nach 12 Stdn. ist die durch die Lichtenergie von 25 000 Lux maximal mögliche Induktion erreicht, längere Bestrahlungsdauer führt zu keiner weiteren Synthesesteigerung. Neben der Belichtungsdauer ist die Lichtintensität für den Grad der Induktion der Anthocyansynthese ausschlaggebend.

In Abb. 4 sind die durch Bestrahlung mit verschiedenen Lichtintensitäten induzierten Cyanidinmengen aufgetragen. Die Pflanzen wurden 3 und 12 Stunden belichtet, die Extraktion der Anthocyane erfolgte 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung. Aus der Abbildung geht hervor, daß selbst bei Bestrahlung mit einer Lichtintensität von 25 000 Lux noch keine Lichtsättigung erreicht wird. Die Anthocyansynthese wird demnach über die Hochenergiereaktion induziert.

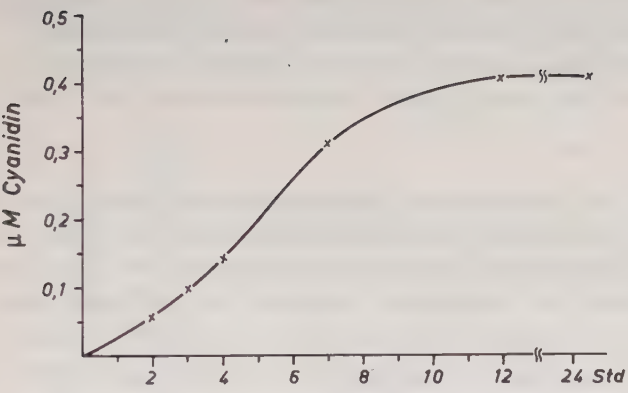


Abb.3:

Induktion der Anthocyansynthese in etiolierten Buchweizenkeimlingen durch verschieden lange Bestrahlung der Pflanzen mit Weißlicht (25 ooo Lux). Die Extraktion der Hypokotyle erfolgte jeweils 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung.

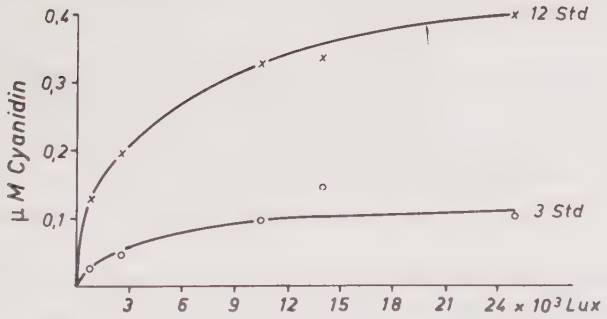


Abb.4:

Induktion der Anthocyansynthese durch verschiedene Weißlicht-Intensitäten. Die Buchweizenkeimlinge wurden 3 Stdn. und 12 Stdn. mit Glühbirnen verschiedener Wattleistung bestrahlt. Die Extraktion der Hypokotyle erfolgte jeweils 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung.

Allgemein kann man sagen, daß bei den meisten biochemischen Untersuchungen zur Flavonoidsynthese, die an Buchweizen durchgeführt wurden, mit zu geringen Lichtintensitäten gearbeitet wurde, um eine maximale Pigmentsynthese zu erreichen.

In Abb. 5 ist die Kinetik der lichtabhängigen Anthocyansynthese dargestellt. 6 Tage alte Dunkelkeimlinge wurden 12 Stdn. mit Weißlicht (25 ooo Lux) bestrahlt. Die Synthese der Anthocyane setzt nach einer 4-5 stündigen lag-Phase ein und hält rund 2o Stdn. an, auch wenn die Belichtung nach 12 Stdn. unterbrochen wird. Die beiden Hauptanthocyane von Fagopyrum zeigen einen voneinander unabhängigen Bildungsverlauf, wobei das Cyanidin-3-glucosid immer nur 2o % der gesamten Anthocyanfraktion ausmacht.

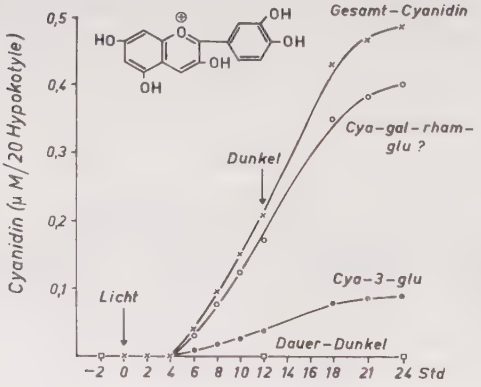


Abb.5:

Kinetik der Anthocyansynthese in Buchweizenhypokotylen bei Bestrahlung der Pflanzen mit Weißlicht (25 ooo Lux). Cya-3-glu = Cyanidin-3-glucosid, Cya-gal-rham-glu = ein Galaktose, Rhamnose und Glucose enthaltendes Anthocyan.

Die Kinetik der Anthocyansynthese bei Bestrahlung der Pflanzen mit verschiedenen Lichtintensitäten zeigt, daß

die Dauer der lag-Phase unabhängig von der Lichtintensität ist (Abb. 6).

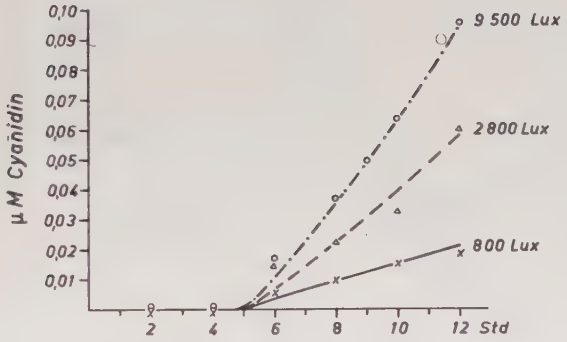


Abb.6:
Kinetik der Anthocyansynthese bei Bestrahlung der Pflanzen mit verschiedenen Lichtintensitäten.

Dies steht im Gegensatz zu den Befunden bei Sorghum; hier konnte mit steigender Lichtintensität die lag-Phase abgekürzt werden (DOWNS und SIEGELMAN, 1963).

Lediglich bei der Kinetik der Anthocyansynthese waagrecht belichteter Keimlinge konnte eine kürzere lag-Phase festgestellt werden, was auf die bessere Lichtrezeption gegenüber den senkrecht belichteten, sich beschattenden Pflanzen zurückgeführt werden kann (Abb. 7).

Wurde bei den in Petrischalen belichteten Keimlingen nur die Wurzel entfernt, so wurde durch 12-stündige Bestrahlung innerhalb von 24 Stdn. die gleiche Anthocyanmenge synthetisiert wie bei den senkrecht belichteten Keimlingen (vgl. Abb.5). Weit geringer ist dagegen die Anthocyansynthese

wenn nur die Hypokotyle belichtet werden. Es spielt dabei keine Rolle, ob die ganzen Hypokotyle (6 cm) oder in 2 cm lange Stücke zerteilte Hypokotyle belichtet werden.

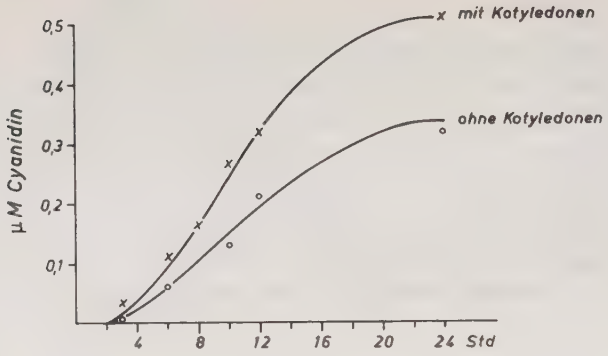


Abb.7:
Kinetik der Anthocyansynthese horizontal bestrahlter Keimlinge.

Man kann jedoch allgemein feststellen, daß sich der Verlauf und der Grad der Pigmentsynthese bei waagrecht in Petrischalen belichteten Keimlingen und bei senkrecht belichteten Keimlingen nicht wesentlich unterscheidet. Dieses Ergebnis ist für die in Teil C und D dargestellten Versuche wichtig.

1.2. Rutin, Leucocyanidin und Chlorogensäure

Einen sehr ähnlichen Verlauf der Lichtinduktion zeigt das Rutin (Abb.8). Rutin liegt zwar auch schon im Hypokotyl der Dunkelkeimlinge vor, die Bildung dieses Flavonols wird jedoch im Licht stark gefördert. 12 Stdn. mit Weißlicht (25 ooo Lux) belichtete Pflanzen enthalten 24 Stdn nach Beginn der Bestrahlung 13,5 mal mehr Rutin als die Dunkelpflanzen.

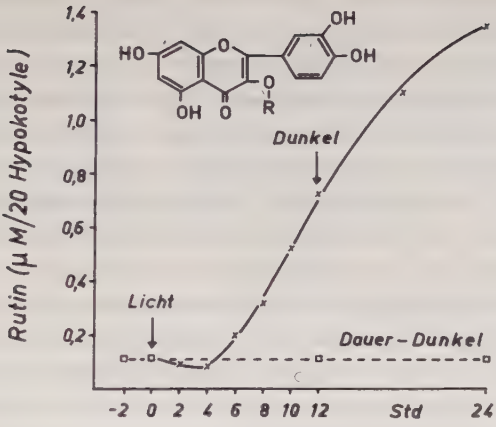


Abb.8:

Kinetik der Steigerung der Rutinsynthese bei Bestrahlung etiolierter Buchweizenkeimlinge mit Weißlicht (25 ooo Lux). Zum Vergleich ist der Rutingehalt von Dunkelkeimlingen aufgetragen. R = Glucose-Rhamnose.

Anders verläuft die Steigerung der Leucocyanidinsynthese durch Licht (Abb. 9).

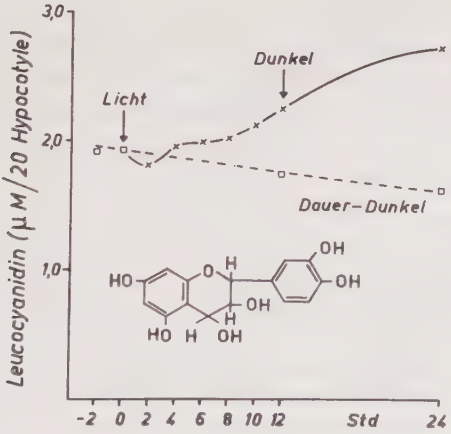


Abb.9:

Kinetik der Steigerung der Leucocyanidinsynthese durch Weißlicht (25 ooo Lux) im Vergleich zur Dunkelkontrolle.

In den etiolierten Fagopyrum-Keimlingen liegt das Leucoanthocyan bereits in großen Mengen vor und ist nach unseren Befunden mengenmäßig die Hauptkomponente der im Buchweizen vorkommenden Phenylpropan-Abkömmlinge. Der Leucoanthocyangehalt im Dunklen gehaltener Keimlinge zeigt eine relativ starke Abnahme während der Versuchsdauer. Werden die Pflanzen belichtet, so beginnt die Leucocyanidinsynthese nach einer lag-Phase von 2 Stunden und nimmt langsam zu. Die relative Zunahme an Leucocyanidin ist gering (ca. 63 %). Im Hinblick auf den Phenylpropanstoffwechsel der Pflanze ist jedoch die absolute Zunahme von ungefähr 1 µMol pro 2o Hypokotyle sehr stark, zumal wenn man bedenkt, daß bei der angewendeten Methode nur etwa 3o % des Gesamt-Leucoanthocyans erfaßt werden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Untersuchungen von TROYER (1964), der feststellte, daß sich der Leucoanthocyangehalt bei Belichtung nicht ändert.

Chlorogensäure kommt bereits in relativ hoher Konzentration in etiolierten Buchweizenkeimlingen vor. Die Kinetik der lichtinduzierten Chlorogensäuresynthese verläuft ähnlich der Kinetik der lichtinduzierten Leucoanthocyansynthese (Abb.1o).

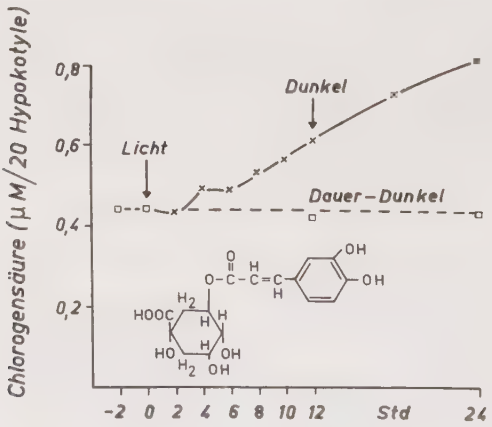


Abb.1o:

Kinetik der Steigerung der Chlorogensäuresynthese durch Weißlicht im Vergleich zur Dunkelkontrolle (25 ooo Lux).

Auch hier dauert die lag-Phase nach Einsatz der Belichtung nur 2 Stunden. Die relative Zunahme über den Dunkelwert beträgt nur 86 %. Die absolute Zunahme liegt aber in der Größenordnung wie die Anthocyanbildung (o,4-o,5 µMol pro 2o Hypokotyle). Die stimulierende Wirkung des Lichts auf die Synthese der Chlorogensäure in Fagopyrum zeigt große Ähnlichkeit mit dem von ZUCKER (1963) in Kartoffelgewebe festgestellten Effekt.

An diesen Ergebnissen läßt sich zeigen, daß in Fagopyrum nicht nur die Biosynthesen flavonoider Verbindungen, die aus Malonat und Zimtsäure aufgebaut werden, im Licht stimuliert werden, sondern auch Chlorogensäure, einem Produkt, das ausschließlich dem Shikimisäurestoffwechsel zuzuordnen ist.

2.) Kontrolle der über die Hochenergiereaktion induzierten Pigmentsynthese durch das Phytochromsystem.

Wie aus Kapitel B, Absatz 1, hervorgeht, erfolgt die Induktion der Pigmentsynthese im Buchweizen über die Hochenergiereaktion (vgl. Abb. 3,4 und 6).

Auch die Induktion der Anthocyansynthese mit DR scheint über eine Hochenergiereaktion zu erfolgen (MOHR und v.NES, 1963). Dafür spricht der in Abb. 11 dargestellte Verlauf der durch DR-Bestrahlung induzierten Anthocyansynthese.

Danach ist, wie bei der Weißlicht-Bestrahlung die induzierte Anthocyanmenge von der Belichtungsdauer abhängig (vgl. Abb.3). Nach 1o Stdn. ist die durch Bestrahlung mit unserem DR-Feld (siehe Material und Methoden) maximal mögliche Induktion erreicht. Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, kann die lichtabhängige Pigmentsynthese in höheren Pflanzen prinzipiell auch über das Phytochromsystem erfolgen. Das Phytochromsystem ist dann nachgewiesen, wenn der Effekt einer Dauer-HR-Bestrahlung durch Lichtstöße ersetzt werden kann,

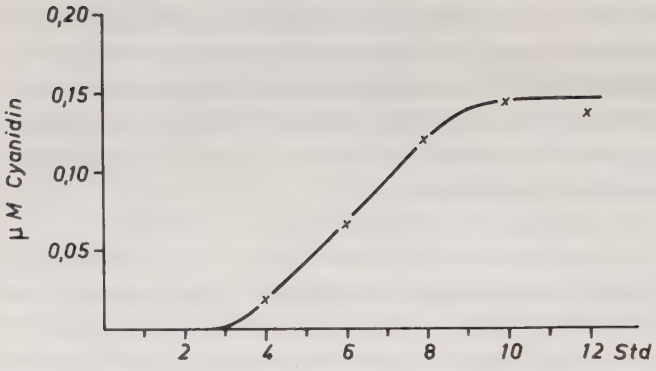


Abb.11:
Induktion der Anthocyansynthese durch Dunkelrot-Bestrahlung. Extraktion der Hypokotyle jeweils 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung.

und wenn eine mit HR durchgeführte Induktion durch nachfolgende Bestrahlung mit DR wieder weitgehend aufgehoben werden kann. MOHR und v.NES (1963) zeigten, daß durch HR-Bestrahlung in Buchweizen die Anthocyansynthese induziert wird, und daß diese Induktion über das Phytochromsystem erfolgt.

Dieses Ergebnis wird durch unsere Untersuchungen bestätigt. Allerdings konnte im Gegensatz zu MOHR und v.NES (1963) nicht der Beweis erbracht werden, daß die Induktion der Anthocyansynthese durch HR quantitativ auf das Phytochromsystem zurückzuführen ist, da die Induktion einer 12-stündigen HR-Bestrahlung nicht durch ein entsprechendes Stoßprogramm ersetzt werden konnte (Abb. 12).

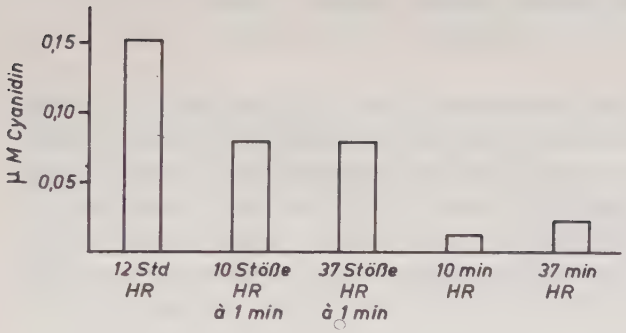


Abb.12:

Die Wirkung von Hellrot-Dauerlicht (12 Stdn., 1o Min. und 37 Min.) auf die Induktion der Anthocyansynthese, verglichen mit der Wirkung von Hellrot-Stößen (1o Stöße von 1 Min., getrennt durch 59 Min. Dunkelheit; 37 Stöße von 1 Min., getrennt durch 17 Min. Dunkelheit).

Bei einem über 12 Stunden ausgedehnten Stoßprogramm mit 1o HR-Stößen von je einer Minute Dauer, getrennt durch 59 Minuten Dunkelheit, wurden 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung aus 2o Hypokotylen o,o79 µMol Anthocyan extrahiert, bei einem erweiterten Stoßprogramm mit 39 HR-Stößen von je einer Minute Dauer, getrennt durch 17 Min. Dunkelheit, ebenfalls nur o,o79 µMol. Dagegen wurde durch 12 Stdn. HR-Dauerlicht o,151 µMol induziert.

So wird über das Phytochromsystem nur eine äußerst geringe Pigmentsynthese induziert, aber die durch 1o bzw. 37 Min. Dauer-HR und die durch 1o bzw. 37 HR-Stöße von je einer Minute Dauer induzierten Anthocyanmengen sprechen dafür, daß allein über das Phytochromsystem eine Induktion möglich ist.

Die für das Phytochromsystem geforderte Reversibilisierung der HR-induzierten Pigmentsynthese durch anschließende DR-Bestrahlung konnte gezeigt werden. Darauf soll jedoch in einem anderen Zusammenhang eingegangen werden.

Diese Ergebnisse bestätigen, daß im Buchweizen die Anthocyansynthese sowohl über die Hochenergiereaktion als auch über das Phytochromsystem induziert werden kann. Beide Systeme wurden bei Fagopyrum bisher stets getrennt betrachtet. Es wurde daher untersucht, inwieweit die über die Hochenergiereaktion induzierte Pigmentsynthese durch das Phytochromsystem beeinflußt wird. Es zeigte sich, daß die durch hohe Weißlicht-Intensitäten induzierte Pigmentsynthese durch kurze, zusätzliche HR-Bestrahlung beträchtlich erhöht werden kann. So wird zum Beispiel durch 3 Stdn. Weißlicht (25 ooo Lux) die Synthese von ca. o,1oo µMol Anthocyan induziert, bei zusätzlicher 1o-minütiger HR-Bestrahlung dagegen o,17o µMol, oder durch 5 Min. Sonnenlicht (9o ooo Lux) o,o15 µMol, mit anschließender 1o Minuten langer HR-Bestrahlung o,o34 µMol (durch 1o Min. HR allein o,o11 µMol). Das bedeutet eine Synthesesteigerung von 7o bzw. 126 %. Besonders stark wirkt sich die zusätzliche HR-Bestrahlung auf die Anthocyansynthese mit Blaulicht bestrahlter Keimlinge aus: die durch 4,5 Stdn. Baulicht induzierte Anthocyanmenge (o,o24 µMol) wird durch anschließende 1o Min. lange HR-Bestrahlung um rund 3oo % gesteigert (Abb. 13).

Da zur Verschiebung des Gleichgewichts $P_{66o} \longrightarrow P_{73o}$ durch HR, auf der die Synthesesteigerung beruht, eine kurze Belichtungszeit genügt, ist die Dauer der HR-Bestrahlung, die für eine maximale Erhöhung der Anthocyansynthese mit Weißlicht belichteter Keimlinge notwendig ist, sehr kurz (Abb. 14).

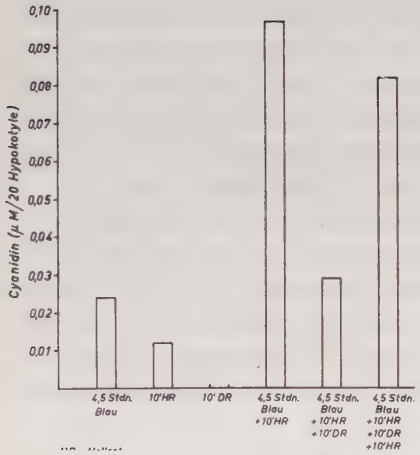


Abb.13:

Steuerung der durch Blaulicht induzierten Anthocyansynthese durch Hellrot und Dunkelrot.

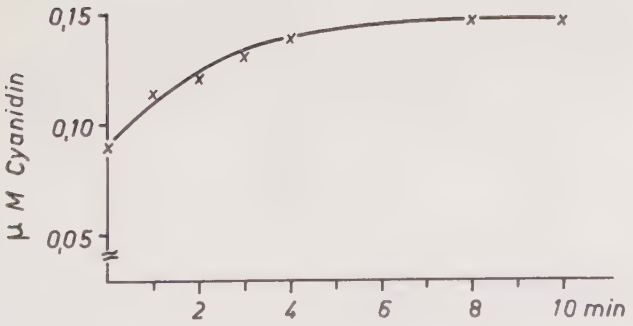


Abb.14:

Steigerung der durch 3 Stdn.Weißlicht induzierten Anthocyansynthese durch Hellrot. Die Keimlinge wurden 3 Stdn. mit Weißlicht, anschließend verschieden lange Zeit mit Hellrot bestrahlt. Die Extraktion der Hypokotyle erfolgte jeweils 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung.

Eine achtminütige Bestrahlungsdauer genügt bereits, um das Gleichgewicht zu verschieben. Werden Buchweizenkeimlinge, die Hochenergiebedingungen ausgesetzt waren, zusätzlich mit DR bestrahlt, so wird die Induktion zum Teil wieder aufgehoben (vgl. auch Abb. 18). Das bedeutet, daß bereits bei Weißlicht-Bestrahlung, durch die im Weißlicht enthaltene HR-Komponente, das Phytochromsystem mit beteiligt ist. Erwartungsgemäß ist die Reversibilisierung prozentual höher, wenn die durch Weißlicht induzierten Anthocyansynthese durch zusätzliche HR-Bestrahlung gesteigert wird. Dies geht aus Abb. 15 hervor, die die prozentuale Reversibilisierung der nur über die Hochenergiereaktion (Weißlicht) und der über die Hochenergiereaktion und Niederenergiereaktion (Weißlicht + HR) induzierten Anthocyansynthese wiedergibt.

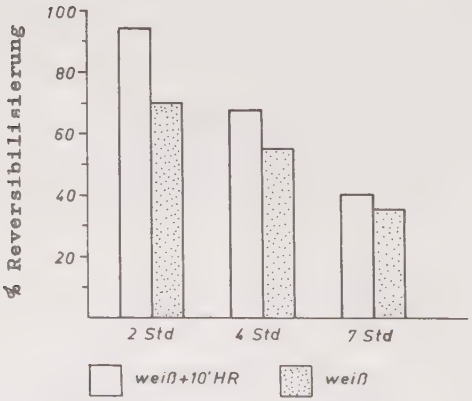


Abb.15:

Reversibilisierung der mit Weißlicht und der mit Weißlicht + Hellrot durchgeführten Induktion der Anthocyansynthese durch Dunkelrot. Induktionszeiten: 2,4 und 7 Stdn. Die Extraktion der Hypokotyle erfolgte 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung.

Die Reversibilisierung erfolgte jeweils nach verschieden langen Induktionszeiten. Aus Abbildung 15 geht außerdem hervor, daß der Grad der Reversibilisierung mit der Dauer der Induktionszeit abnimmt.

Eine zeitliche Abhängigkeit dieser Reversibilisierung zeigt die Abbildung 16. Die Induktion durch 9o Min. Weißlicht + lo Min. HR kann durch anschließend lo Minuten lange DR-Bestrahlung fast völlig wieder aufgehoben werden (99 %). Nach 4 Stdn. Weißlicht + lo Min. HR, also gegen Ende der lag-Phase, ist dagegen nur noch eine Reversibilisierung um 67 % möglich.

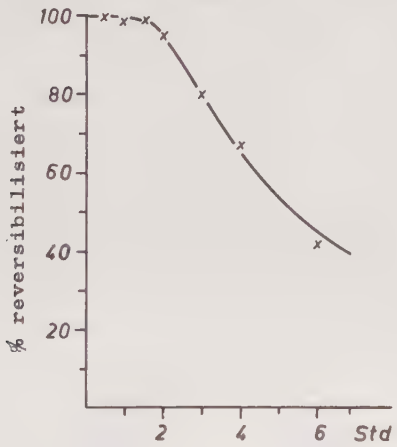


Abb.16:

Zeitliche Abhängigkeit der Reversibilisierung der durch die Hochenergiereaktion induzierten Anthocyansynthese. Die Keimlinge wurden nach verschieden langer Weißlicht + lo Min. Hellrot-Bestrahlung lo Min. mit Dunkelrot bestrahlt. Die Extraktion der Hypokotyle erfolgte 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung.

Wird die DR-Bestrahlung nicht unmittelbar an die Weißlicht/HR-Bestrahlung angeschlossen, so nimmt der Reversibilisierungseffekt ebenfalls ab. 1o Min. DR reversibilisiert, unmittelbar nach einer 3-stündigen Weißlicht/1o Min.HR-Induktion gegeben, um 8o %; erfolgt die DR-Bestrahlung dagegen erst 4 Stdn. nach der Induktion, so wird die Anthocyansynthese nur noch um 45 % reversibilisiert. Dieses Verhalten steht in völliger Übereinstimmung mit den von DOWNS und SIEGELMAN (1963) an Sorghum gefundenen Ergebnissen.

Die Reversibilisierung kann durch erneute Bestrahlung mit HR weitgehend wieder aufgehoben werden (Abb.17,vgl.auch Abb.13).

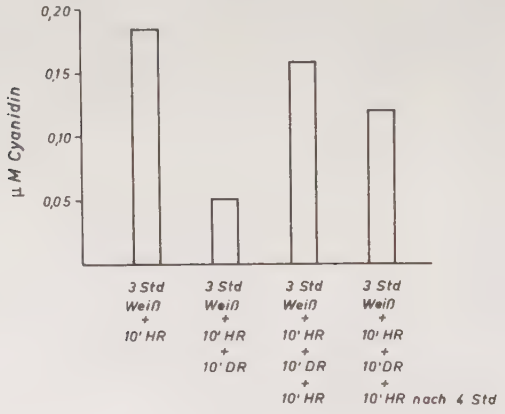


Abb.17:
Die teilweise Reversibilisierung der mit Weißlicht und Hellrot durchgeführten Induktion der Anthocyansynthese durch Dunkelrot und die Aufhebung dieser Reversibilisierung durch Bestrahlung mit Hellrot unmittelbar und 4 Stdn. nach der Dunkelrot-Bestrahlung.

Auch hier ist der Grad der Annulierung der DR-Bestrahlung von der Zeit zwischen der Weißlicht/HR/DR-Bestrahlung und der erneuten HR-Bestrahlung abhängig. So kann die durch DR reversibilisierte Anthocyansynthese 3 Stdn. Weißlicht/1o Min. HR

belichteter Keimlinge durch sofortige HR-Bestrahlung um 182 % gesteigert werden; bestrahlt man jedoch erst 4 Stdn. nach der DR-Gabe mit HR, dann ist nur noch eine Steigerung von 116 % möglich.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die durch die Hochenergiereaktion induzierte Anthocyansynthese durch das Phytochromsystem kontrolliert wird. Daß dieser Regulierung nicht nur die Anthocyansynthese unterworfen ist, sondern alle von uns in Fagopyrum identifizierten Phenylpropanderivate, geht aus Abbildung 18 hervor: die lichtabhängige Steigerung der Synthese von Leucoanthocyan und Rutin, aber auch von Chlorogensäure, die keine flavonoide Verbindung ist, kann durch DR aufgehoben, die Reversibilisierung durch erneute HR-Bestrahlung wieder annuliert werden. Demnach wird die über die Hochenergiereaktion induzierte Synthese dieser Pigmente durch das Phytochromsystem gesteuert.

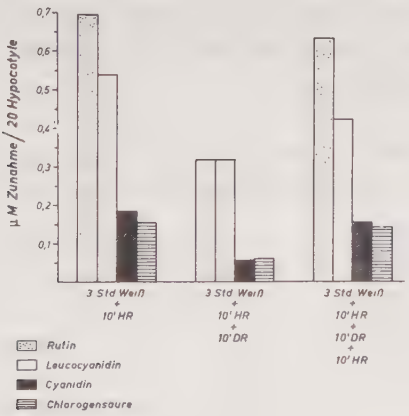


Abb.18:

Die teilweise Reversibilisierung der über die Hochenergiereaktion induzierten Synthese der Phenylpropanderivate durch Dunkelrot und die Aufhebung dieser Reversibilisierung durch Hellrot.

C. Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Vorstufen des A-Rings

An welcher Stelle die Lichtinduktion bei der Biosynthese der Pigmente eingreift, ist nicht bekannt. Wie eingangs erwähnt, wurden 2 völlig voneinander abweichende Hypothesen aufgestellt; so sehen HARRASCHAIN und MOHR (1963), HENDRICKS und BORTHWICK (1965) und KANDELER (1960, 1964) als Folge der Bestrahlung eine gesteigerte Anlieferung von Vorstufen für den A-Ring des Flavonoidgerüsts, während THIMANN und RADNER (1955, 1958, 1962) annehmen, daß bei der lichtinduzierten Anthocyansynthese das Nucleinsäuresystem sowie Protein-Neusynthese beteiligt sind. Die letzte Auffassung konnte von zahlreichen Forschern begründet werden, dagegen fehlen Arbeiten, in denen der Stoffwechsel von Malonyl-CoA in belichteten und unbelichteten Pflanzen untersucht wird. Dies beruht nicht zuletzt auf dem Mangel einer geeigneten Methode, die es ermöglicht eine Änderung des Malonyl-CoA-pools in vivo nachzuweisen. Diese Untersuchung könnte durch die quantitative Bestimmung einer Verbindung erfolgen, deren Biosynthese lediglich von dem Angebot an Malonyl-CoA in der Pflanze abhängig ist.

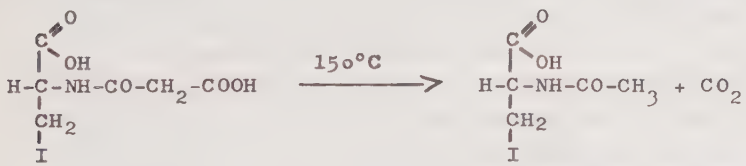
1. Nachweis der Änderung des Malonyl-CoA-pools durch Bestimmung des Malonyl-Tryptophan-Gehalts der Pflanzen.

Von diesen Überlegungen ausgehend untersuchten wir den Konjugationsmechanismus von Malonyl-Tryptophan. GOOD und ANDREAE (1957) stellten fest, daß in Spinatblättern, die mit DL-Tryptophan inkubiert wurden, Malonyl-Tryptophan synthetisiert wird. Unsere Untersuchungen wurden an 7 Tage alten Helianthus-Keimlingen durchgeführt. Die Pflanzen wurden 48 Stdn. mit einer 2×10^{-3} m D- oder L-Tryptophanlösung inkubiert, anschließend mit heißem, 80%igem Alkohol extrahiert, die Extrakte eingeengt und auf Schleicher und Schüll-Papier 2043b im Laufmittel Isopropanol : NH_3 : H_2O = 6:1:2

aufsteigend chromatographiert. Die Indolverbindung wurde auf dem Chromatogramm mit dem Ehrlich-Reagenz (Äthanol-HCl-Lösung, 1 % p-Dimethylaminobenzaldehyd) nachgewiesen. In den mit D-Tryptophan, nicht jedoch in den mit L-Tryptophan inkubierten Pflanzen wurde eine Verbindung gefunden, die den gleichen Rf-Wert wie das synthetische Malonyl-Tryptophan besitzt. Die Identität dieser Verbindung mit Malonyl-Tryptophan wurde auf verschiedene Weise ermittelt.

1.1. Identifizierung des D-Tryptophan-Stoffwechselproduktes der höheren Pflanzen.

Das D-Tryptophan-Stoffwechselprodukt der Helianthus-Keimlinge wies in allen angewandten Laufmitteln der Papier- und Dünnschichtchromatographie (siehe Material und Methoden) stets den gleichen Rf-Wert auf, wie das synthetische Malonyl-Tryptophan; auch papierelektrophoretisch war es mit dem synthetischen Malonyl-Tryptophan identisch. Neben den chromatographischen Untersuchungen konnte die Identität dieser Indolverbindung mit Malonyl-Tryptophan an Hand der Reaktionsprodukte, die nach der Decarboxylierung und Hydrolyse der Verbindung auftreten, nachgewiesen werden. Erhitzt man Malonyl-Tryptophan auf etwa 150°C, so wird bereits nach 5 Min. CO_2 von der Malonsäure abgespalten und es entsteht Acetyl-Tryptophan.



I = Indol

Es konnte gezeigt werden, daß bei Erhitzung der aus Helianthus isolierten Indolverbindung Acetyl-Tryptophan entsteht: die Verbindung wurde punktförmig auf Schleicher und Schüll-Papier

2o43b aufgetragen und 4o Min. bei 15o°C erhitzt. Das entstandene Acetyl-Tryptophan wurde durch Chromatographie an Hand von synthetischem Acetyl-Tryptophan als Vergleichssubstanz nachgewiesen. Außerdem wurden sauere und alkalische Hydrolysen durchgeführt; das dabei entstandene Tryptophan wurde chromatographisch nachgewiesen. Alle diese Untersuchungen sind ein Beweis dafür, daß in den mit D-Tryptophan inkubierten Helianthus-Keimlingen Malonyl-Tryptophan synthetisiert wird. Auch in anderen höheren Pflanzen wurde die Malonylierung von D-Tryptophan festgestellt. Auf die Verbreitung des Konjugationsmechanismus im Pflanzenreich wird später eingegangen.

1.2. Bestimmung der Konfiguration des Malonyl-Tryptophans.

Die Tatsache, daß nur D-Tryptophan, jedoch nicht L-Tryptophan in Pflanzen acyliert wird, ist ein Hinweis dafür, daß dem Malonyl-Tryptophan die D-Konfiguration zukommt. Der Nachweis wurde an Malonyl-Tryptophan durchgeführt, das aus Myrrhis odorata isoliert wurde. Ein Stengel dieser Pflanze wurde 3 Wochen lang mit einer 2×10^{-3} m DL-Tryptophan-Lösung gefüttert. Zur Isolierung des synthetisierten Malonyl-Tryptophans wurde der Stengel im Homogenisator mit einer 0,3 m $NaHCO_3$-Lösung zerkleinert und der Brei anschließend mit $(NH_4)_2SO_4$ gesättigt. Nach alkalischer Ätherextraktion wurde das Filtrat mit H_3PO_4 angesäuert (pH 2,5) und ausgeäthert, der Äther eingedampft und der Rückstand chromatographiert. Die Malonyl-Tryptophan-Zone wurde eluiert und zur Reinigung rechromatographiert. Das gereinigte Malonyl-Tryptophan wurde 3 Stdn. bei 100°C mit 2 n H_2SO_4 hydrolysiert und das freigesetzte Tryptophan durch präparative Chromatographie isoliert. Die Menge des gewonnenen Tryptophans wurde nach UDENFRIEND und PETERSON (1957) bestimmt. Zur Bestimmung der Konfiguration wurden 2 µMol des gewonnenen Tryptophans nach BOULANGER und OSTEUX (1962) mit

D-Aminosäure-Oxydase oxydiert. Bei der Oxydation von einem Mol D-Aminosäure entsteht 1 Mol Ketosäure und 1 Mol NH_3, dabei werden o,5 Mol Sauerstoff verbraucht. Der Sauerstoffverbrauch ist ein Maß für die Menge der in der Probe enthaltenen D-Aminosäure. Die Messungen wurden in der Warburgapparatur durchgeführt. Abb. 19 stellt den zeitlichen Verlauf der Oxydation dar.

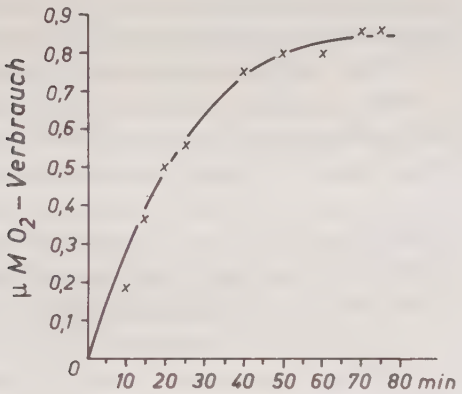


Abb.19:

Sauerstoffverbrauch bei der enzymatischen Oxydation des Tryptophananteils von Malonyl-Tryptophan mit D-Aminosäure-Oxydase (es wurden 2 µMol Tryptophan zur Oxydation eingesetzt).

Nach 7o Min. ist die Oxydation beendet; es wurde eine Sauerstoffaufnahme von 21 µl gemessen, das entspricht der Oxydation von 1,87 µMol D-Tryptophan. Die bei der Oxydation entstandene Indolbrenztraubensäure konnte durch Papierchromatographie nachgewiesen werden. Dadurch wurde bewiesen, daß der Tryptophankomponente des in Pflanzen synthetisierten Malonyl-Tryptophans die D-Konfiguration zukommt.

1.3. Die Verbreitung des Malonyl-D-Tryptophan-Konjugationsmechanismus im Pflanzenreich.

Dieser Konjugationsmechanismus, die Malonylierung von D-Tryptophan, ist im Pflanzenreich weit verbreitet. Es zeigte sich, daß die Acylierung besonders stark bei Angiospermen (189 getestete Arten) verbreitet ist. Sie konnte bei 94 % der untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden und zwar zu 98 % bei den Dikotyledonen und zu 78 % bei den Monokotyledonen. Von 25 untersuchten Gymnospermenarten bildeten 17 Malonyl-D-Tryptophan, bei 18 getesteten Farnen konnte in 12 Fällen dieser Acylierungstyp nachgewiesen werden. Auch bei den altertümlichen Schachtelhalmen ist dieser Konjugationsmechanismus vorhanden. Hier wurden bei 3 mit D-Tryptophan gefütterten Arten Malonyl-D-Tryptophan gefunden. Bei Bärlappgewächsen (4 untersuchte Arten) und Moosen (35 untersuchte Arten) ist dieser Konjugationsmechanismus mit Malonsäure jedoch nicht nachzuweisen. Allerdings ist bemerkenswert, daß bei einigen der Bryopsida, im Gegensatz zu anderen Moosen, nach Fütterung mit D-Tryptophan ein Produkt auftritt, das ähnliche Eigenschaften wie Acetyltryptophan besitzt. Jedoch tritt dieses Produkt, selbst nach Verfütterung von D-Tryptophan an mehrere 100 g des Pflanzenmaterials, nur in so geringen Mengen auf, daß es nicht eindeutig als Acetyltryptophan identifiziert werden konnte.

Nach der Inkubation von Pilzen mit D-Tryptophan tritt ein Stoffwechselprodukt auf, das durch Dünnschicht- und Papierchromatographie sowie durch Elementaranalyse als Acetyl-D-Tryptophan identifiziert werden konnte. Acetyl-D-Tryptophan wird sowohl von Basidiomyceten als auch von Ascomyceten gebildet. Acetyl-D-Tryptophan war bereits von LUCKNER (1963) als Stoffwechselprodukt des D-Tryptophans bei Penicillium viridicatum gefunden worden. Obwohl von Algen D-Tryptophan aufgenommen wurde, konnte in der gesamten Gruppe kein Stoff-

wechselprodukt des D-Tryptophans nachgewiesen werden. Auch bei 11 untersuchten Bakterienarten wurden keine acylierten Tryptophan-Metabolite gefunden. Aus der Gleichförmigkeit der Stoffwechselprodukte nach der D-Tryptophan-Fütterung kann jedoch geschlossen werden, daß diese Organismengruppe in weitgehendem Maße zur Racemisierung der optischen Isomere des Tryptophans befähigt ist, wie dies ja durch den enzymatischen Nachweis der Racemase schon bewiesen wurde (BEHRMAN, 1962).

Acylierte Verbindungen des D-Tryptophans konnten bei Tieren nach Fütterung von D-Tryptophan nicht nachgewiesen werden; weder bei Anneliden noch bei Arthropoden oder Chordaten trat eine derartige Verbindung auf.

Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die untersuchten Pflanzengruppen; Spalte 1 gibt die Zahl der getesteten Pflanzen an, Spalte 2 und 3 das Auftreten von Acetyltryptophan bzw. Malonyltryptophan, Spalte 4 den in vivo-Nachweis einer Tryptophan-Racemase. In der 5. Spalte ist jeweils ein repräsentativer Vertreter genannt.

Da analog der Reaktion bei Pilzen, denen Acetyl-CoA als Acyldonator dient (ZENK und SCHMITT, 1965), bei den höheren Pflanzen Malonyl-CoA der Acyldonator ist (ZENK, 1966), erfüllt Malonyl-D-Tryptophan die eingangs erwähnten Bedingungen, die zu einer Untersuchung des Malonyl-CoA-pools notwendig sind.

Gruppe	Anzahl	Acetyl-Tryptophan	Malonyl-Tryptophan	Racemase	Repräsentativer Vertreter
Bacteria	11	-	-	6	Proteus vulgaris
Cyanophyceae	1	-	-	-	Anacystis nidulans
Chlorophyceae	5	-	-	-	Scenedesmus spec.
Conjugatophyceae .	2	-	-	-	Spirogyra spec.
Charophyceae	1	-	-	-	Chara foetida
Xanthophyceae	1	-	-	-	Tribonema aequale
Phaeophyceae	3	-	-	-	Fucus vesiculosus
Rhodophyceae	2	-	-	-	Batrachospermum moniliforme
Ascomycetes	7	2	-	1	Saccharomyces cerevisiae
Basidiomycetes ...	25	2o	-	-	Cantharellus cibarius
Lichenes	4	-	-	-	Cladonia silvatica
Anthoceropsida ...	1	-	-	-	Anthoceros laevis
Marchantiopsida ..	15	-	-	-	Marchantia polymorpha
Sphagnopsida	1	-	-	-	Sphagnum spec.
Bryopsida	18	4?	-	-	Ctenidium molluscum
Lycopsida	4	-	-	-	Lycopodium selago
Sphenopsida	3	-	3	-	Equisetum variegatum
Filicopsida	18	-	12	-	Dryopteris spinulosa
Coniferopsida	19	-	12	-	Pinus strobus
Taxopsida	2	-	2	-	Taxus baccata
Ginkgopsida	1	-	1	-	Ginkgo biloba
Cycadopsida	3	-	2	-	Cycas revoluta
Dicotyledoneae ...	157	-	154	-	Astragalus cicer
Monocotyledoneae..	32	-	25	-	Acorus calamus

Tab.4: Verbreitung der D-Tryptophan-Stoffwechselmechanismen im Pflanzenreich.

2. Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Synthese von Malonyl-D-Tryptophan.

2.1. Der Einfluß der Tryptophankonzentration auf die Aufnahme durch Buchweizenkeimlinge.

Wesentlich für die Untersuchungen ist die Aufnahme von D-Tryptophan durch die Pflanzen; sie wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der Inkubationslösung bestimmt. Jeweils 2o, 6 Tage alte Buchweizenkeimlinge wurden 16 Stdn. in 1o ml D-Tryptophan-^{14}C-Lösung verschiedener Konzentration im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Keimlinge in 2 × 1o ml heißem Methanol extrahiert, die Extrakte mit Methanol auf ein Volumen von 25 ml gebracht und die Radioaktivität gemessen. Abb. 2o zeigt die Aufnahme von D-Tryptophan in Abhängigkeit von der angebotenen Konzentration.

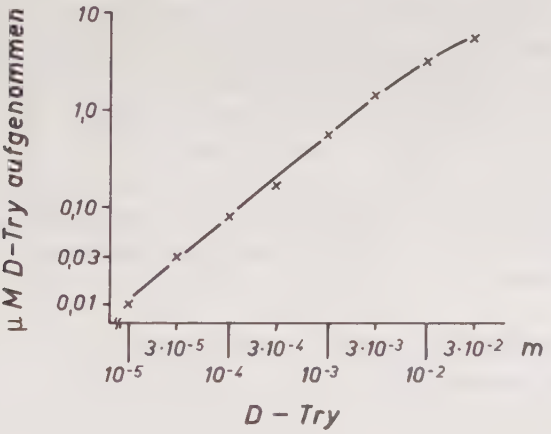


Abb.2o:
Einfluß der Konzentration auf die Aufnahme von D-Tryptophan durch Buchweizen.

Die Aufnahme von D-Tryptophan nimmt mit steigender Konzentration stark zu. Auch bei einer 2 × 10^{-3}m D-Tryptophan-Lösung tritt noch keine Sättigung der Aufnahme ein.

2.2. Aufnahme von D- und L-Tryptophan durch belichtete und unbelichtete Pflanzen.

Es ist für die Untersuchung des Malonyl-CoA-pools mit D-Tryptophan wesentlich, inwieweit sich die Aufnahmekapazität belichteter und unbelichteter Pflanzen unterscheidet und ob die Aufnahme von der Konfiguration des Tryptophans abhängig ist.

Jeweils 2o, 6 Tage alte Keimlinge wurden 24 Stdn. in 1o ml einer 10^{-3}m D- oder L-Tryptophan-^{14}C-Lösung in 25o ml Erlenmeyerkölbchen inkubiert. Zur Bestrahlung der Pflanzen mit HR während der Inkubationszeit wurden die Kölbchen in eine Lichtwarburgapparatur gehängt. Nach der Inkubationszeit wurden die Pflanzen wie beschrieben extrahiert. Die Messung der radioaktiven Extrakte ergab, daß D- und L-Tryptophan von belichteten und unbelichteten Pflanzen in gleicher Menge aufgenommen wird. Die Konfiguration der Aminosäure spielt demnach keine Rolle bei der Aufnahme durch die Pflanze. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Ergebnissen von SCHRAUDOLF und BERGMANN (1965); die Autoren stellten fest, daß Sinapis-Hypokotyle L-Tryptophan doppelt so rasch wie D-Tryptophan aufnehmen.

2.3. Die Umsatzgeschwindigkeit von D-Tryptophan in belichteten und unbelichteten Keimlingen.

Die vorausgegangenen Untersuchungen haben gezeigt, daß auch bei einer 2 × 10^{-3}m D-Tryptophan-Inkubationslösung noch keine Sättigung der D-Tryptophanaufnahme eintritt und daß die Aufnahmegeschwindigkeit durch Licht nicht beeinflußt wird. Dies bestätigt, daß in belichteten und unbelichteten Pflanzen, die in einer 10^{-3}m D-Tryptophan-Lösung inkubiert werden, die

Synthese von Malonyl-D-Tryptophan nicht durch das D-Tryptophan-Angebot bestimmt wird. Der limitierende Faktor ist vielmehr das Malonyl-CoA. Eine Erhöhung des Malonyl-CoA-pools durch das Licht müßte daher zu einer Erhöhung der Biosynthese von Malonyl-D-Tryptophan führen. Zum Nachweis einer Veränderung des Malonyl-CoA-pools durch Bestrahlung wurden 6 Tage alte Buchweizenkeimlinge 24 Stdn. in einer 10^{-3}m D-Tryptophan-^{14}C-Lösung entweder im Hellrotfeld oder im Dunklen inkubiert, anschließend auf die im Kapitel "Material und Methoden" beschriebene Weise extrahiert, chromatographiert, die Tryptophan- sowie Malonyl-D-Tryptophan-Zone eluiert und der prozentuale Gehalt an Malonyl-D-Tryptophan durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Die Flavonole wurden nach der Methode von HARRASCHAIN und MOHR (1963) extrahiert und gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

	Absorption bei 343 nm	Malonyl-D-Tryptophan
Dunkel	0,39	28,7 %
Hellrot	0,58	26,4 %

Tab.5: Prozentuale Acylierung des D-Tryptophan-^{14}C in belichteten und unbelichteten Buchweizenkeimlingen. (Mittelwert aus 15 Bestimmungen mit je 20 Pflanzen) (Die Absorption bei 343 nm dient als relatives Maß der Flavonsynthese, vgl. HARRASCHAIN und MOHR, 1963)

Aus der Tabelle geht hervor, daß durch Licht die Acylierung von D-Tryptophan nicht gesteigert wird, eine Erhöhung des Malonyl-CoA-pools durch Licht ist daher unwahrscheinlich. Dagegen stieg unter den gewählten Bedingungen die Flavonoidkonzentration um rund 50 %.

3. Die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase in belichteten und unbelichteten Pflanzen.

Eine weitere Methode, die Hypothese der gesteigerten Malonyl-CoA-Anlieferung zu prüfen, bestand in der Bestimmung der Aktivität des Enzyms: Acetyl-CoA-Carboxylase. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der CO_2-Fixierung durch Enzymrohextrakte, die aus belichteten und unbelichteten Buchweizenkeimlingen gewonnen wurden, zusammengestellt.

	Absorption bei 343 nm	$^{14}CO_2$-Fixierung (IPM)
Dunkel	o,38	781
Weißlicht	o,62	785

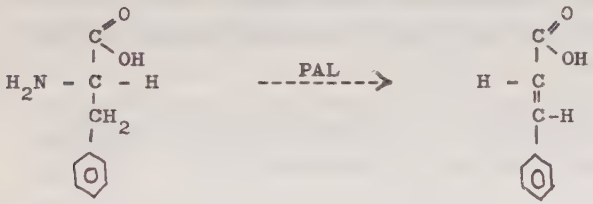
Tab.6: CO_2-Fixierung durch Enzym-Rohextrakte aus belichteten und unbelichteten Pflanzen. Inkubationszeit 6o Min. bei 3o°C. Reaktionsansatz (1 ml): 5 µMol $KH^{14}CO_3$ (= 2 × $1o^6$ IPM); 5o µMol K-Phosphat pH 7,8; 8 µMol $MgCl_2$; 5 µMol ATP; 1o µMol Acetylphosphat; o,2 µMol CoA; o,oo2 mg Phosphotransacetylase; Proteingehalt des eingesetzten Enzym-Rohextraktes: 3,4 mg. Die Reaktion wurde mit o,1 ml $HClO_4$ (2o%ig) unterbrochen und nach MATSHUHASAI et al. (1964) aufgearbeitet.

Der Nachweis, daß es sich bei der CO_2-Fixierung um Malonsäure handelt, wurde durch Chromatographie geführt.

D. Der Einfluß des Lichtes auf die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in Buchweizenkeimlingen.

Die vorausgehenden Versuche haben gezeigt, daß entgegen der Auffassung von HARRASCHAIN und MOHR (1963), HENDRICKS und BORTHWICK (1965) und KANDELER (1964, 1966) in Buchweizen das

Licht keine gesteigerte Anlieferung von Vorstufen für den A-Ring des Flavonoidgerüsts bewirkt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß in den Dunkelkeimlingen die Anlieferung der Vorstufen des B-Rings der Flavonoide, der Zimtsäure, limitiert ist. KOUKOL und CONN (1961) wiesen in Hordeum vulgare das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL; EC 4.3.1.5.) nach, das die Deaminierung von L-Phenylalanin zu trans-Zimtsäure katalysiert.



Von der Aktivität dieses Enzyms hängt es ab, welches Zimtsäure-Angebot der Pflanze zur Verfügung steht. ZUCKER (1965) beschrieb bereits bei Untersuchungen zur Chlorogensäure-Biosynthese eine Aktivierung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Kartoffelgewebe durch Licht. Allerdings fand unter diesen Versuchsbedingungen eine Erhöhung des gesamten Proteingehalts im Gewebe statt.

1. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase in unbelichteten und belichteten Buchweizenkeimlingen.

Wir haben nun die Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Buchweizen-Dunkelkeimlingen und in Keimlingen, die jenen Hochenergiebedingungen ausgesetzt waren, die die Anthocyansynthese stark induzieren, untersucht. Die Enzymaktivität wurde photometrisch nach der Methode von ZUCKER (1965) bestimmt. Wie eingangs erwähnt, wurde als spezifische Aktivität definiert: µMol Zimtsäure, gebildet von 1 mg Protein in 6o Min. bei 4o°C. Während der Belichtung erfolgt im Buchweizen keine meßbare Proteinzunahme. Die spezifische Aktivität 6 Tage alter, 12 Stdn. mit

Weißlicht (25 ooo Lux) bestrahlter Keimlinge betrug o,18o, im Gegensatz zur spezifischen Aktivität 6 Tage alter Dunkelkeimlinge, die nur o,o3 betrug. Die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase wird demnach durch die 12-stündige Bestrahlung um 5oo % gesteigert. Die gleiche Erhöhung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität durch Licht zeigt sich auch eindeutig, wenn man die spezifische Aktivität nicht auf den Proteingehalt der Pflanze bezieht, sondern auf die Aktivität der Hexokinase, deren spezifische Aktivität in belichteten und unbelichteten Pflanzen gleich ist (SCHERF und ZENK, 1967).

1.1. Kinetik der Zunahme der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität bei Belichtung.

Die Kinetik der Aktivitätszunahme der Phenylalanin-Ammonium-Lyase durch Bestrahlung von Buchweizenkeimlingen mit Weißlicht (25 ooo Lux) zeigt Abb. 21.

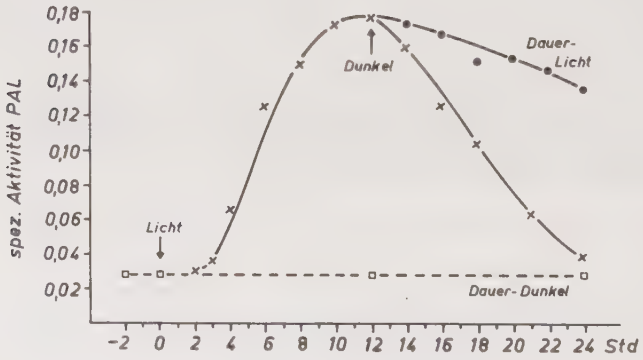


Abb.21:
Steigerung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in Buchweizenkeimlingen durch Bestrahlung der Pflanzen mit Weißlicht. Beleuchtungsstärke: 25 ooo Lux; Temperatur zur Zeit der Bestrahlung 25-27°C, zur Zeit der Nachreaktion im Dunklen 29°C.

Nach Beginn der Belichtung bleibt die Enzymaktivität 2-3 Stunden konstant, nimmt dann stark zu und erreicht etwa lo Stdn. nach Lichtbeginn ein Maximum. Im kontinuierlichen Licht nimmt die spezifische Aktivität des Enzyms schwach ab, wogegen nach einer Überführung der Pflanzen in Dunkelheit zum Zeitpunkt des Enzym-Maximums ein rapider Abfall der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität bis zum Ausgangswert eintritt. Wird nach einem Bestrahlungsprogramm von 12 Stdn. Licht, 9 Stdn. Dunkelheit nochmals belichtet, so steigt die spezifische Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase nach einer lag-Phase von 3 Stdn. wieder an, diesmal jedoch wesentlich schwächer, auf das ca. 3-fache des Dunkelwertes, um dann 5 Stdn. nach dem zweiten Lichtbeginn wieder abzufallen (Abb. 22). Diese zweite Belichtung induziert aber trotz des Anstiegs der Enzymaktivität keine zusätzliche Anthocyansynthese mehr.

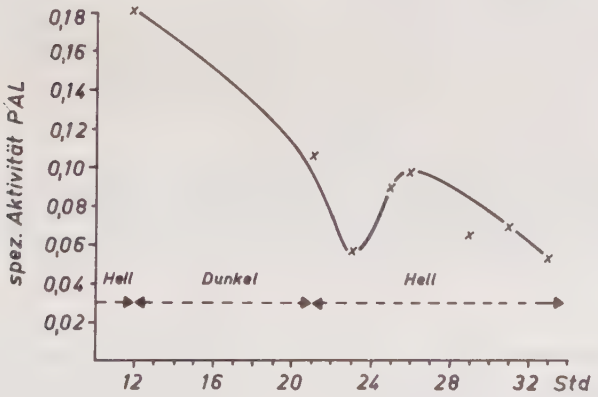


Abb.22:

Einfluß von Weißlichtbestrahlung auf die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase vor 9 Stdn. belichteter Buchweizenkeimlinge.

1.2. Die Abhängigkeit der Phenylalanin-Ammonium-Lyase von der Beleuchtungsstärke.

In Abb. 23 ist der Energiebedarf der Anthocyansynthese und der Enzyminduktion dargestellt.

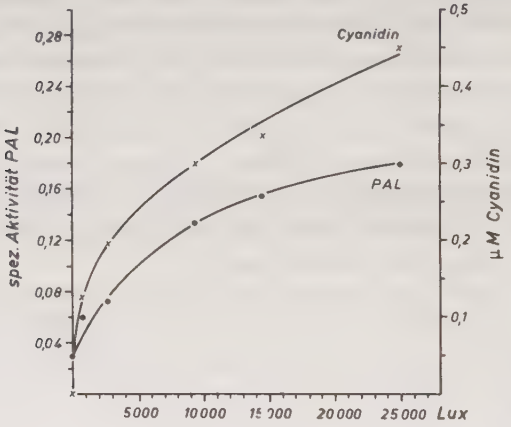


Abb.23:

Die Anthocyansynthese und die Aktivierung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke. Belichtungszeit: 12 Stunden; Cyanidinbestimmung 24 Stdn. nach Lichtbeginn; Enzym-Aktivitäts-Bestimmung 12 Stdn. nach Lichtbeginn.

Aus Abb. 23 geht hervor, daß die Steigerung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität und der Anthocyan-Induktion weitgehend parallel verläuft, dabei kommt deutlich durch den Kurvenverlauf zum Ausdruck, daß es sich bei beiden Prozessen nur um Hochenergiereaktionen handeln kann; in beiden Fällen wurde bei 25 ooo Lux noch keine Lichtsättigung erreicht.

1.3. Der Einfluß von Proteinhemmstoffen auf die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase.

Eine Steigerung der Enzymaktivität ließ sich weder durch Belichtung von Enzym-Rohextrakten aus Dunkelkeimlingen oder belichteten Keimlingen (Abb. 24), noch durch Dialyse oder Gelfiltration des Rohenzyms erreichen.

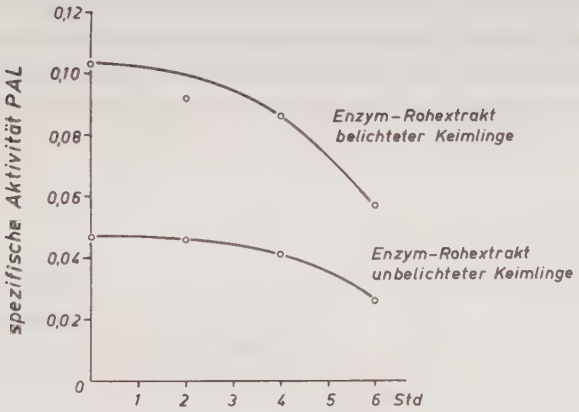


Abb.24:
Bestrahlung des Enzym-Rohextrakts belichteter und unbelichteter Buchweizenkeimlinge. Die Extrakte wurden 6 Stdn. mit Weißlicht (25 ooo Lux) bestrahlt. In Abständen von 2 Stdn. wurde die Enzymaktivität bestimmt.

Damit scheinen die Möglichkeiten, daß es sich bei dem Lichteffekt um eine allosterische Aktivierung des Enzyms oder um die Zerstörung eines niedermolekularen Hemmstoffes handelt, ziemlich ausgeschlossen zu sein. Wurden aktive Enzympräparate aus belichteten Keimlingen den Dunkelextrakten zugesetzt, so addieren sich die Enzymaktivitäten; dies spricht auch gegen einen makromolekularen Hemmstoff der Phenylalanin-Ammonium-Lyase. Als wahrscheinlichster Mechanismus bleibt somit eine de novo Synthese der Phenylalanin-Ammonium-Lyase

als Folge der Belichtung. Um diese Annahme zu untermauern, wurden die Keimlinge mit den bekannten Hemmstoffen der Proteinbiosynthese: Cycloheximid und L-Äthionin, im Licht inkubiert. Zunächst mußte untersucht werden, ob diese Hemmstoffe einen Einfluß auf die lichtinduzierte Anthocyansynthese ausüben. Etiolierte Buchweizenkeimlinge wurden 1 Std. im Dunklen, anschließend 12 Stdn. bei Weißlicht-Bestrahlung (25 ooo Lux) mit L-Äthionin- und Cycloheximid-Lösung verschiedener Konzentration inkubiert und sofort nach Beendigung der Bestrahlung extrahiert. In Abb. 25 ist der Einfluß der Hemmstoffe, in Abhängigkeit von der Konzentration, auf die Anthocyansynthese dargestellt.

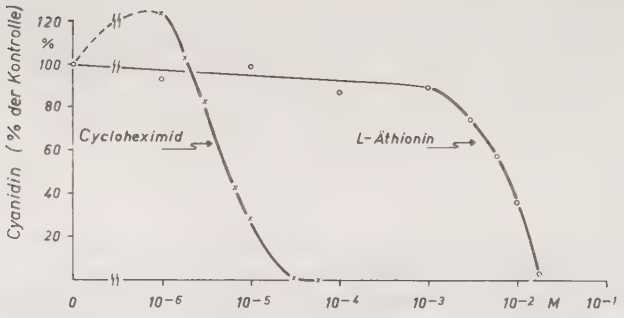


Abb. 25:
Hemmung der lichtinduzierten Anthocyansynthese durch L-Äthionin und Cycloheximid. Cyanidin-Bestimmung nach der 12-stündigen Belichtung.

Eine völlige Unterdrückung der Synthese kann durch eine 3×10^{-5}m Cycloheximid-Lösung und durch eine 2×10^{-2}m L-Äthionin-Lösung erreicht werden.

Dieser Versuch läßt vermuten, daß bei der lichtabhängigen Pigmentsynthese in Fagopyrum auch Protein-Neusynthese beteiligt ist. Nachdem die entsprechenden Konzentrationen der Hemmstoffe ermittelt waren, die zu einer völligen Unterdrückung der Anthocyansynthese führen, wurde der Einfluß der Proteingifte auf die lichtinduzierte Phenylalanin-Ammonium-Lyase untersucht. Zur Inkubation von L-Äthionin wurden 6 cm lange Hypokotyle in 2 cm lange Stücke zerschnitten, die vor der lo-stündigen Belichtung eine Stunde im Dunklen vorinkubiert wurden. Abb. 26 zeigt, daß durch die Inkubation der Keimlinge mit einer $2 \times lo^{-2}$m L-Äthionin-Lösung sowohl die Anthocyansynthese als auch die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase völlig unterdrückt werden.

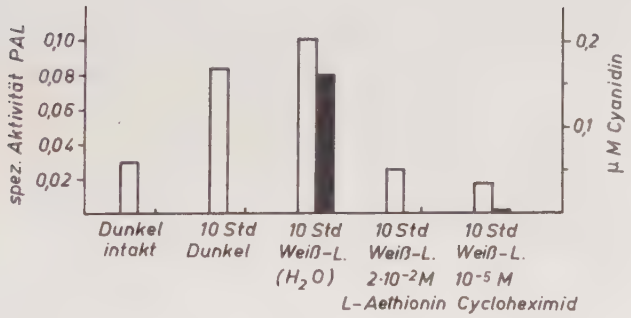


Abb. 26:
Aktivitätsbestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase und die Induktion der Anthocyansynthese durch Weißlicht in Gegenwart der Proteinhemmstoffe L-Äthionin und Cycloheximid. Belichtungszeit lo Stdn., 25 ooo Lux. Die Keimlinge wurden in 2 cm lange Stücke zerteilt.

□ = Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität

■ = µMol Cyanidin.

Den gleichen Effekt erzielt man mit einer 3×10^{-5}m Cycloheximid-Lösung. Dabei ist jedoch zu bemerken, daß die mit hohen Konzentrationen Cycloheximid behandelten Keimlinge teilweise geschädigt waren, während die sehr hohe Konzentration an L-Äthionin keinerlei Einfluß auf die Turgeszenz des Gewebes hatte.

Durch diesen Versuch kommt zum Ausdruck, daß bei Verwundung des Gewebes die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in ähnlicher Weise gesteigert wird, wie durch Licht. Die Zunahme der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität ist dabei abhängig vom Grad der Verletzung. In Abb. 27 ist die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität von Dunkelkeimlingen, die in verschieden lange Stücke zerteilt und anschließend 10 Stdn. im Dunklen in Petrischalen inkubiert wurden, dargestellt. Bereits die Halbierung der Pflanzen erhöht die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase um 100 %. Dieser Anstieg kann durch Proteinhemmstoffe quantitativ verhindert

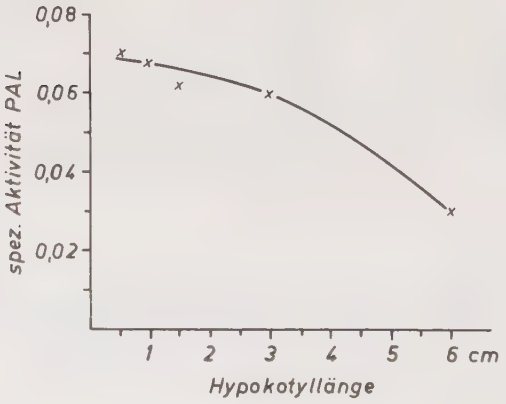


Abb.27:
Der Einfluß von Wundflächen auf die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität.

werden (vgl. Abb. 26). Die Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit Befunden von MINAMIKAWA und URITANI (1965a, 1965b) an Süßkartoffelwurzeln. Weiterhin demonstriert dieser Versuch, daß allein ein höheres Angebot von Zimtsäure, wie es z.B. durch Verletzung hervorgerufen wird, nicht genügt, um eine Anthocyanbildung zu induzieren. Es muß neben der erhöhten Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität für die Pigmentbildung mindestens e i n Enzym in der Biosynthesekette des Anthocyans völlig neu gebildet werden; ein Effekt, der jedoch nur durch Licht, nicht aber durch Verwundung induziert werden kann.

2. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in Hellrot und Dunkelrot belichteten Buchweizenkeimlingen.

So wie die Anthocyansynthese in Buchweizenkeimlingen über einen längeren Zeitraum mit DR induziert werden kann, wird auch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in etiolierten Keimlingen bei DR-Bestrahlung erhöht (Abb. 28).

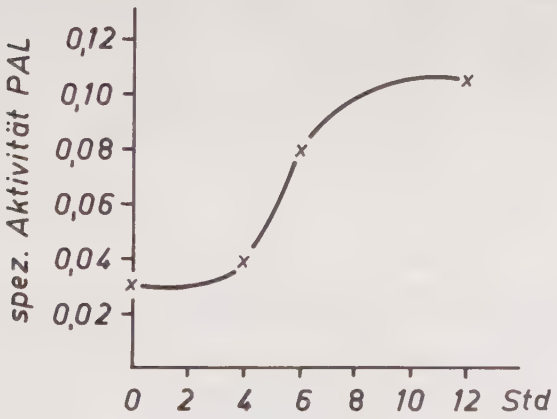


Abb.28:
Aktivierung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität durch Dunkelrot-Bestrahlung.

Die Bestrahlungszeit, die notwendig ist um eine maximale Aktivitätserhöhung zu induzieren, beträgt, wie bei der Induktion mit Weißlicht, ca. lo Stunden. Die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität durch DR-Bestrahlung verläuft demnach ebenfalls über eine Hochenergiereaktion.

Bei Bestrahlung mit HR wird die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase dagegen nur etwa um das Doppelte des Ausgangswertes erhöht (Abb. 29). Das Aktivitäts-Maximum wird bereits nach 4-stündiger Bestrahlung erreicht, im kontinuierlichen Licht nimmt die Enzymaktivität dann wieder langsam ab.

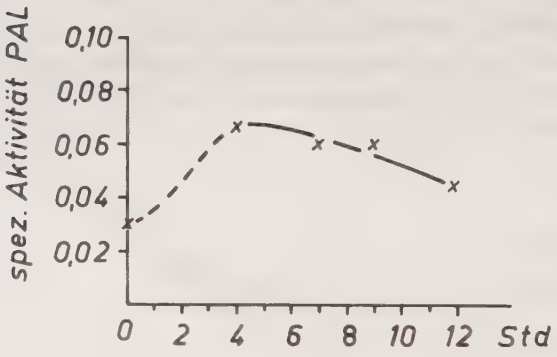


Abb.29:
Aktivierung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in Buchweizenkeimlingen durch Hellrot-Bestrahlung.

Auch dieser Versuch bestätigt, daß die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase über eine Hochenergiereaktion erfolgt.

3. Der Einfluß des Phytochromsystems auf die durch Weißlicht induzierte Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität.

Wie bereits in Kapitel B gezeigt wurde, kontrolliert das Phytochromsystem die durch die Hochenergiereaktion induzierte Anthocyansynthese; dieser Regulierung ist auch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität unterworfen. Abb. 3o zeigt die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in Buchweizenkeimlingen, die 3 Stdn. mit Weißlicht und anschließend mit HR und DR bestrahlt wurden. Die Anthocyanmengen, die unter den jeweiligen Lichtbedingungen induziert wurden, sind parallel dazu dargestellt.

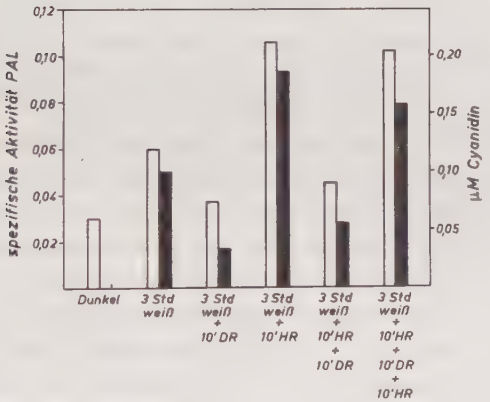


Abb.3o:

Der Einfluß des Phytochromsystems auf die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase und auf die Induktion der Anthocyansynthese. Die Bestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität erfolgte 12 Stdn. nach Beginn der Belichtung, die Bestimmung der Anthocyanmenge 24 Stdn. nach Beginn der Belichtung.
□ = Phenylalanin-Ammonium-Lyase
■ = µMol Cyanidin

Sowohl die Anthocyansynthese als auch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität der mit Weißlicht bestrahlten Keimlinge werden beträchtlich erhöht, wenn zusätzlich lo Min. mit HR bestrahlt wird. Diese Aktivitätserhöhung wird durch DR-Bestrahlung zum Teil wieder aufgehoben und die Wirkung der DR-Bestrahlung kann durch erneute HR-Bestrahlung annuliert werden.

IV. D I S K U S S I O N

Die Bestrahlung etiolierter Buchweizenkeimlinge mit hohen Weißlichtintensitäten führt zur Akkumulierung von Chlorogensäure und großer Mengen flavonoider Verbindungen. Die Synthese dieser Substanzen erfolgt nicht sofort nach Belichtungsbeginn, sondern erst nach einer lag-Phase von etwa 2-4 Stunden und setzt sich dann über ca. 2o Stunden fort. Nach der Lichtinduktion laufen die Synthesen auch im Dunklen ab. Die Bildung dieser Pigmente wird durch eine blaulichtabhängige Hochenergiereaktion induziert. Der Lichtreceptor dieser Hochenergiereaktion, die durch das Phytochromsystem kontrolliert wird, scheint nicht das Phytochromsystem selbst zu sein. Dies entspricht den von DOWNS und SIEGELMAN (1963) für die Anthocyansynthese in Sorghum gefundenen Verhältnissen. Etwa 2/3 der durch Licht induzierbaren Cyanidinmenge in Buchweizen wird unter unseren Bedingungen durch das blaulichtabhängige Hochenergiesystem induziert, während maximal nur 1/3 der Pigmentmenge in Folge der Bestrahlung mit Dauerhellrot oder Dauerdunkelrot (Phytochrom ?) gebildet wird (Abb. 31).

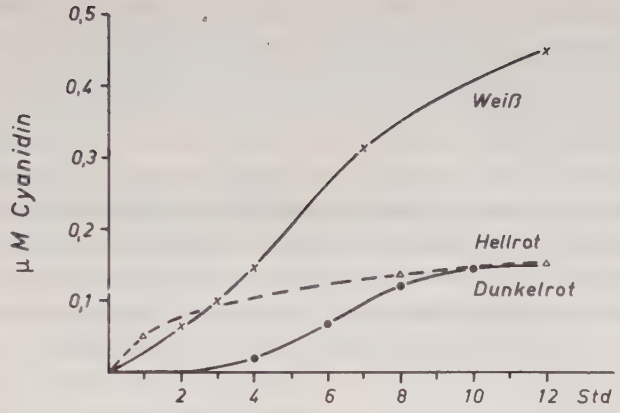


Abb.31:

Die Induktion der Anthocyansynthese durch Weißlicht, Hellrot und Dunkelrot in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit. Die Cyanidinbestimmung erfolgte jeweils 24 Stdn. nach Bestrahlungsbeginn.

Nach den in der Einleitung zitierten Befunden und vor allem durch die Untersuchungen von ZUCKER (1963, 1965) kann es heute als gesichert gelten, daß das Licht einen "morphogenetischen" Einfluß durch die Dereprimierung von Genen ausübt, wodurch es zur Bildung neuer, oder zur Aktivitätssteigerung bereits vorhandener Enzyme durch de novo Synthese kommt. Diese Ansicht konnte in der vorliegenden Arbeit experimentell auch für die Synthese flavonoider Verbindungen wahrscheinlich gemacht werden.

Die folgenden Befunde sprechen, bei Annahme der heute allgemein akzeptierten Bildungssequenz, für die Aufhebung der Reprimierung von m-RNS Synthese bei Belichtung etiolierter Buchweizenkeimlinge :

1) Eine 2-4 stündige lag-Phase nach Belichtungsbeginn bis zum Einsetzen der Synthese von Cyanidin, Rutin, Leucocyanidin und Chlorogensäure.

2) Die Hemmung der Bildung dieser Phenylpropanabkömmlinge durch die Proteinsynthesegifte Cycloheximid und Äthionin.

3) Der Nachweis der spezifischen Induktion des Schlüsselenzyms des Phenylpropanstoffwechsels, der Phenylalanin-Ammonium-Lyase, durch Licht (vgl. SCHERF und ZENK, 1967); der spezifische Verlauf dieser Induktion mit einer 2-stündigen lag-Phase sowie die Hemmung der Synthese dieses Enzyms durch Proteinhemmstoffe.

Durch diese Befunde wird die von THIMANN und RADNER (1955, 1958, 1962) seit langer Zeit vertretene Ansicht bestätigt, daß bei der lichtabhängigen Anthocyansynthese Proteinneubildung beteiligt ist. Es muß hier nochmals betont werden, daß das durch die Steigerung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität erhöhte Angebot an Zimtsäure nicht die Anthocyansynthese induziert. Es müssen auf dem Weg zum Anthocyan ein oder mehrere Enzyme, wahrscheinlich zwischen Dihydroflavonol und Anthocyan (vgl.GRISEBACH, 1965) de novo gebildet werden.

Dieser Regulationsmechanismus wirft eine Reihe interessanter Fragen auf. Besonders wichtig erscheint uns die Beteiligung des Phytochromsystems an der Hochenergie-Enzyminduktion. Der primäre Effekt der Blaulicht-Hochenergiereaktion muß nach unseren Vorstellungen in der Entfernung von Repressoren des Genoms liegen. Dies wird auch von ENGELSMA (1965, 1966) für die Akkumulierung gewisser Phenole durch Blaulichtbestrahlung von Gurkenkeimlingen gefordert. Diese Dereprimierung führt bei Fagopyrum aber noch nicht zur Bildung von m-RNS, was sich in einer Cyanidin- und Protein-Neusynthese ausdrücken würde; erst wenn genügend Phytochrom in der P_{730}-Form vorliegt, sind diese Synthesen möglich. Auf Grund unserer Befunde und den von DOWNS und SIEGELMAN (1963) ermittelten Ergebnissen

läßt sich die hypothetische Aussage machen, daß die eigentliche Dereprimierung des Genoms durch die Blaulicht-Hochenergiereaktion erfolgt, das Phytochromsystem jedoch in ein Endglied des Dereprimierungsvorgangs oder in den Transcriptionsprozeß selbst eingreift. Erst wenn genügend P_{730} in der aktiven Form vorliegt, kann die Proteinneusynthese erfolgen, dagegen verhindert P_{660} diese Synthese. Die Induktion des relativ geringen Betrages an Cyanidin und damit an Enzym, der durch Rotlichtbestrahlung allein gebildet werden kann, muß dann so erklärt werden, daß ein gewisser Teil der Gene bereits dereprimiert ist, sich aber wegen des Fehlens von P_{730} nicht realisieren kann.

Eine weitere Stützung erfährt diese Auffassung, nämlich daß die Funktion des Phytochroms nach der Dereprimierung durch die Hochenergiereaktion zu suchen ist, dadurch, daß die Anthocyaninduktion während der dreistündigen lag-Phase bis zur Enzymneusynthese, zu einer Zeit also, wo man die Bildung der m-RNS annehmen muß, die Hochenergiereaktion hundertprozentig durch eine 10 Minuten DR-Bestrahlung verhindert werden kann (Abb.32). Ist die Enzymsynthese nach der 2-stündigen lag-Phase angelaufen, geht die Möglichkeit der Cyanidin-Reversibilisierung zurück und beträgt nach 6 Stunden, wenn also schon 67 % der induzierbaren Phenylalanin-Ammonium-Lyase bereits gebildet sind, nur noch 42 %. Der Verlauf der Reversibilisierung der Cyanidinsynthese durch DR ist also in etwa umgekehrt proportional der Bildung des Enzyms (Abb.32).

Die Wirkung von P_{660} auf die Hochenergie-Anthocyansynthese entspricht formal der von LANGE und MOHR (1965) gefundenen Wirkung des Actinomycin D auf die Anthocyansynthese. Actinomycin hemmt wahrscheinlich auf dem Transcriptionsniveau, obgleich in der letzten Zeit Zweifel an der Spezifität dieser Substanz wie auch an dem von oben genannten Autoren verwendeten Puromycin laut geworden sind (LARZLO et al., 1966; APPLEMAN und KEMP, 1966).

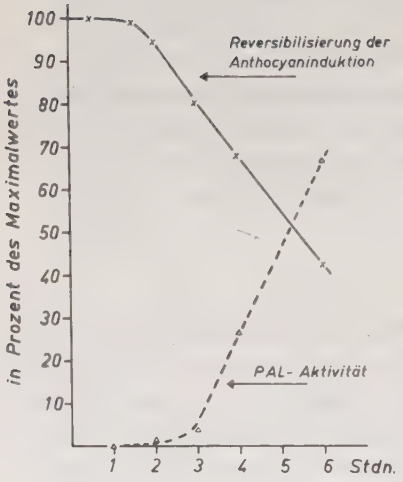


Abb.32:

Reversibilisierung der Induktion der Anthocyansynthese und zeitlicher Verlauf der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivitätssteigerung. Die Keimlinge wurden mit Weißlicht bestrahlt; zur Prüfung der Reversibilisierbarkeit wurden sie nach verschiedenen Zeiten lo Min. im Dunkelrot belichtet und blieben anschließend bis Versuchsende (24 Stdn. nach Lichtbeginn) im Dunklen; die Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivitätsbestimmung nach der Weißlichtbestrahlung erfolgte zu den angegebenen Zeiten; der Dunkelwert des Enzyms wurde abgezogen.

Im Gegensatz zu der Ansicht von MOHR (1966), der die Rolle des Phytochroms in der "Genaktivierung", also in dem Dereprimierungsvorgang selbst, sieht, scheint zumindest in Fagopyrum und Sorghum das Phytochrom nicht primär an der Dereprimierung beteiligt zu sein. Zweifel an der Auffassung von MOHR über die Phytochromwirkung haben bereits die experimentellen Daten von HAUPT (1959), FONDEVILLE et al. (1966), FEIERABEND und PIRSON (1966) sowie MAPSON und SWAIN (1966) gebracht. Möglicherweise kommen dem Phytochromsystem jedoch völlig verschiedene Funktionen im Stoffwechsel der Pflanze zu, was allerdings von MOHR (1966) bestritten wird.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

I. Isolierung und Identifizierung verschiedener phenylpropanoider Verbindungen aus Buchweizenkeimlingen :

Es wurden drei Anthocyane, die jeweils Cyanidin als Aglycon enthalten, in reiner Form isoliert. Das in Fagopyrum am stärksten vertretene Anthocyan besteht zu etwa gleichen Teilen aus Cyanidin, Rhamnose, Glucose und Galaktose. Ein Cyanidinglycosid mit diesen Zuckerkomponenten ist bisher noch nicht beschrieben worden. Ein weiteres Anthocyan konnte als Cyanidin-3-glucosid identifiziert werden. Nur in Spuren kommt das dritte Anthocyan vor, bei dem es sich wahrscheinlich um Cyanidin-Tri-glucosid handelt.
Die im Buchweizen vorliegenden Leucoanthocyane wurden als Leucocyanidin-Derivate identifiziert; außerdem wurde das Auftreten von Rutin und Chlorogensäure bestätigt.

II. Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Biosynthese von Anthocyanen, Leucoanthocyan, Rutin und Chlorogensäure führten zu folgenden Ergebnissen:

Alle Verbindungen, außer den Anthocyanen, liegen bereits in den Dunkelkeimlingen vor, jedoch wird die Biosynthese sämtlicher Zimtsäure-Abkömmlinge in etiolierten Keimlingen durch Bestrahlung mit Weißlicht hoher Energie (25 ooo Lux) drastisch gesteigert. Die lichtinduzierten Synthesen setzen nach einer lag-Phase von 2-4 Stunden ein. Die Induktion erfolgt über eine Blaulicht abhängige Hochenergiereaktion, die durch das niederenergetische Phytochromsystem gesteuert wird; der Lichtrezeptor der Hochenergie-

reaktion ist jedoch nicht das Phytochromsystem selbst. Für die lichtinduzierte Biosynthese der Pigmente muß die Dunkelrot absorbierende Form des Phytochroms (P_{730}) vorhanden sein; die Hellrot absorbierende Form des Phytochroms (P_{660}) verhindert die Biosynthese. Die lag-Phase zwischen dem Belichtungsbeginn und dem Auftreten von Anthocyan wird von der Lichtintensität nicht beeinflußt. In den ersten 8 Stunden nach Lichtbeginn hängt der Grad der Pigmentsynthese sowohl von der Lichtintensität als auch von der Bestrahlungsdauer ab.

III. Die Hypothesen über den Mechanismus der lichtstimulierten Synthese flavonoider Verbindungen wurden experimentell untersucht. Zur Frage inwieweit durch Bestrahlung etiolierter Keimlinge eine Steigerung des Vorläufers des A-Ringes der flavonoiden Verbindungen, des Malonyl-CoAs, stattfindet, wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet, den Malonyl-CoA-pool der Pflanzen in vivo zu bestimmen. Die Methode beruht auf der Tatsache, daß D-Tryptophan in höheren Pflanzen durch Malonyl-CoA acyliert wird. Es wurden Bedingungen gewählt, bei denen die Malonyl-D-Tryptophan-Synthese in Fagopyrum allein durch das Angebot von Malonyl-CoA begrenzt wird. Die Untersuchungen ergaben, daß die Belichtung der Buchweizenkeimlinge, durch die die Flavonolsynthese um 50 % gegenüber der Dunkelkontrolle stimuliert wird, nicht zu einer vermehrten Malonyl-D-Tryptophan-Synthese führt. Die direkte Bestimmung der Aktivität des Enzyms Acetyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.2.) belichteter und unbelichteter Buchweizenkeimlinge zeigte, daß die spezifische Aktivität dieses Enzyms durch Licht nicht verändert wird. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß der Malonyl-CoA-pool in belichteten und unbelichteten Buchweizenkeimlingen keinen mit den angewendeten Methoden meßbaren Unterschied aufweist. Damit scheint die Hypothese, daß als unmittelbare Lichtwirkung bei der Biosynthese der flavonoiden Verbindungen eine ver-

mehrte Anlieferung der Vorstufen des A-Ringes stattfindet, hinfällig zu sein.
Weiter wurde die Verbreitung des D-Tryptophan-Stoffwechselmechanismus im Pflanzenreich untersucht. Es lassen sich vier große Gruppen im Hinblick auf ihr Vermögen, D-Tryptophan zu metabolisieren, unterscheiden:

Die Bakterien, die D-Tryptophan entweder nach dem "aromatic pathway" oder den "quinolinic pathway" abbauen (vgl. LUCKNER, 1963) und Racemase besitzen.

Die Algen und die meisten Moose, die das Tryptophan zwar aufnehmen, aber nicht weiter umbauen können.

Die Pilze, die die Aminosäure acetylieren, wobei die Ascomyceten auch zur Racemisierung befähigt sind.

Die Pteridophyten (ohne Bärlappe) und Spermatophyten, die D-Tryptophan ausschließlich zu malonylieren vermögen, nicht jedoch racemisieren oder acetylieren können.

IV. Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Aktivität des Enzyms L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (EC 4.3.1.5.), das L-Phenylalanin zu Zimtsäure deaminiert und somit die Vorstufe des B-Ringes des Flavonoidgerüstes der genannten Pigmente liefert, führte zu folgenden Ergebnissen :

Die spezifische Aktivität der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase in etiolierten Buchweizenkeimlingen wird durch Bestrahlung der Keimlinge mit Weißlicht (25 000 Lux) um 500 % gesteigert; die spezifische und Gesamtaktivität der Hexokinase bleibt jedoch in belichteten und unbelichteten Buchweizenkeimlingen gleich. Die Aktivitätserhöhung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase setzt nach einer lag-Phase von 2-3 Stunden ein, erreicht nach ca. 10 Stunden ein Maximum und fällt von diesem Zeitpunkt, nach Beendigung der Belichtung rasch, im Dauerlicht langsam, auf den Ausgangswert zurück. Wie die Induktion der

Pigmentsynthese erfolgt die Steigerung der Enzymaktivität ebenfalls über eine Hochenergiereaktion, die durch das niederenergetische Phytochromsystem gesteuert werden kann. Die Biosynthese von Cyanidin wird ebenso wie die Aktivierung der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase durch die Proteinsynthesegifte Cycloheximid und L-Äthionin gehemmt.

V. Auf Grund der unter Punkt II und IV genannten Befunde läßt sich folgende Hypothese über die Lichtwirkung bei der Biosynthese flavonoider Verbindungen im Buchweizen aufstellen :

Das Licht übt einen "morphogenetischen" Einfluß auf die Dereprimierung gewisser Gene aus. Der Dereprimierungsvorgang wird über eine Hochenergiereaktion induziert. Das Phytochromsystem wird nach dem Dereprimierungsvorgang wirksam; es kontrolliert den Transcriptionsprozess oder aber es stellt ein Endglied des Dereprimierungsvorgangs dar. Nur wenn genügend Phytochrom P_{730} vorliegt erfolgen Protein-Neusynthesen, die zur Bildung flavonoider Verbindungen führen.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

APPLEMAN, M., and R.G.KEMP: Puromycin: a potent metabolic effect independent of protein synthesis. Biochem.Biophys.Res.Commun.24, 564-568 (1966).

AUERBACH, V.H., and W.E.KNOX: L-Kynurenine and N-Formyl-L-kynurenine. I. Preparation and properties of L-Kynurenine. In: Methods in Enzymology III, S.62o, Academic Press Inc., New York 1957.

BATALIN, A.: Die Einwirkung des Lichts auf die Bildung des roten Pigments. Acta Horti Petropol. 6, I (1879).

BEHRMAN, E.J.: Tryptophan metabolism in Pseudomonas. Nature (Lond.) 196, 15o-152 (1962).

BOULANGER, P. und R.OSTEUX: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1962.

CREASY, L.L., and T.SWAIN: Flavon production in strawberry leaves. Phytochem. 5, 5o1-5o9 (1966).

DOWNS, R.J., and H.W.SIEGELMAN: Photocontrol of anthocyanin synthesis in Milo seedlings. Plant Physiol. 38, 25-3o (1963).

ENGELSMA, G.: Photo-induced hydroxylation of cinnamic acid in gherkin hypokotyls. Nature (Lond.) 2o8, 1117-1119 (1965).

ENGELSMA, G.: The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. III.Hydroxylation of cinnamic acid. Acta Bot.Neerl. 15, 394-4o5 (1966).

ENGELSMA, G., and G.MEIJER: The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. Acta Bot.Neerl. 14, 54-72 (1965).

FEIERABEND, I. und A.PIRSON: Die Wirkung des Lichts auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Roggenkeimlingen. Z.Pflanzenphysiol. 55, 235-245 (1966).

FONDEVILLE, I.C., H.A.BORTHWICK and S.B.HENDRICKS: Leaflet movement of Mimosa Pudica L. indicative of phytochrome action. Planta 69, 357-364 (1966).

GOOD, N.E., and W.A.ANDREAE: Malonyl-tryptophan in higher plants. Plant Physiol. 32, 561-566 (1957).

GOVINDARAJAN, V.S., and A.G.MATHEW: Anthocyanidins from leucoanthocyanidins. Phytochem.4, 985-988 (1965).

GRISEBACH, H. und M.BOPP: Untersuchungen über den biogenetischen Zusammenhang zwischen Quercetin und Cyanidin beim Buchweizen mit Hilfe ^{14}C-markierter Verbindungen. Z.Naturforschg.14b, 485-490 (1959).

GRISEBACH, H.: Biosynthesis of flavonoids. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, T.W.Goodwin, ed., S.279-308, Academic Press London and New York 1965.

HARBORNE, J.B.: Plant Polyphenols. 1. Anthocyanin production in cultivated potato. Biochem.J.74, 262-269 (1960).

HÄNSEL, R. und L.HÖRHAMMER: Photochemisch-systematische Untersuchungen über Flavonglycoside einiger Polygonaceen. Arch.Pharm.287, 189-198 (1954).

HARRASCHAIN, H. und H.MOHR: Der Einfluß sichtbarer Strahlung auf die Flavonoidsynthese und Morphogenese der Buchweizenkeimlinge (Fagopyrum esculentum Moench). II. Flavonolsynthese und Hypokotylwachstum. Z.Bot. 51, 277-299 (1963).

HAUPT, W.: Die Chloroplastendrehung bei Mougeotia. I. Über den quantitativen und qualitativen Lichtbedarf bei Schwächlichtbewegung. Planta 53, 484-502 (1959).

HENDRICKS, S.B., and H.A.BORTHWICK: The physiological functions of phytochrome. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, T.W.Goodwin, ed., S.405-436, Academic Press London and New York 1965.

HESS, D.: Die Beteiligung von Ribonucleinsäure an der Gen-gesteuerten Induktion der Anthocyansynthese bei Petunia. Planta 61, 73-89 (1964).

HESS, D. und Ch.MEYER: Dünnschichtchromatographie von Anthocyanen. Z.Naturforschg. 17b, 853-854 (1962).

HÖRHAMMER, L. und A.SCHERM: Über das Vorkommen zyklischer Pflanzensäuren bei einigen Polygonaceen und Betulaceen. Arch.Pharmaz.288/60, 441-447 (1955).

JONESCO, St.: Les anthocyanidines et les leucoanthocyanidines chez les vegetaux. Ann.Sc.Nat.ser.10,Botan.12, 249-305 (1930).

KANDELER, R.: Über die Lichtabhängigkeit der Anthocyanbildung. Flora 149, 487-519 (1960).

KANDELER, R.: Wirkung des Kohlendioxyds auf die Blütenbildung von Lemna gibba. Naturwiss. 51, 561-562 (1964).

KAROW, H. und H.MOHR: Aktivitätsänderungen der Isocitritase (EC 4.1.3.1.) während der Photomorphogenese beim Senfkeimling (Sinapis alba L.). Planta 72, 170-186 (1967).

KARSTENS, W.K.H.: Anthocyanin and anthocyanin formation in seedlings of Fagopyrum esculentum Moench. Rec.Trav.bot.neerl. 36, 85-174 (1939).

KLEIN, A.O., and Ch.W.HAGEN,Jr.: Anthocyanin production in detached petals of Impatiens balsamina L. Plant Physiol.36, 1-9 (1961).

KOUKOL, J., and E.E.CONN: Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. J.biol.Chem.236, 2692-2698 (1961).

KUILMAN, L.W.: Physiologische Untersuchungen über die Anthocyane. Rec.Trav.bot.neerl. 27, 287-416 (193o).

LANGE, H. und H.MOHR: Die Hemmung der phytochrominduzierten Anthocyansynthese durch Actinomycin D und Puromycin. Planta 67, 1o7-121 (1965).

LARZLO, J., D.S.MILLER and K.S.McCARTY: Actinomycin D: inhibition of respiration and glycolysis. Science 151, 1oo7-1o1o (1966).

LOWRY, H.O., N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR and R.J.RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275 (1951).

LUCKNER, M.: Über Bildung und Stoffwechsel von α-N-Acetyl-D-Tryptophan und α-N-Acetyl-D-Kynurenin bei Penicillium viridicatum. Z.allg.Mikrobiol.3, 93-1oo (1963).

LUCKNER, M.: Über neue Arbeiten zur Biosynthese der Alkaloide. 3. Teil: Die Bildung von Verbindungen mit Chinolinringsystem. Pharmazie 18, 93-1o6 (1963).

MAHLER, H.R.: Studies on the fatty acid oxidizing system of animal tissues.IV. The prosthetic group of butyryl Coenzym A dehydrogenase. J.Biol.Chem.2o6, 13-26 (1954).

MAPSON, L.W., and T.SWAIN: Control of photooxidation and reduction of ascorbate by phytochrome or similar compound. Phytochem.5, 829-853 (1966).

MARGULIES, M.M.: Effect of chloramphenicol on light dependent development of seedlings of Phasaeolus vulgaris var. Black Valentine, with particular reference to development of photosynthetic activity. Plant Physiol.37, 473-48o (1962).

MATSUHASHI, M., S.MATSUHASHI, S.NUMA und F.LYNEN: Zur Biosynthese der Fettsäuren.IV. Acetyl-CoA Carboxylase aus Hefe. Biochem.Z.340, 243-262 (1964).

MINAMIKAWA, T., and I.URITANI: Phenylalanin deaminase in sliced or black rot-infected sweet potato roots. Arch.Biochem.Biophys.108, 573-574 (1964).

MINAMIKAWA, T., and J.URITANI: Phenylalanine-ammonia-lyase in sliced sweet potato roots. J.Biochem. (Tokio) 57, 678-688 (1965a).

MINAMIKAWA, T., and J.URITANI: Phenylalanin-ammonia-lyase in sliced sweet potato roots. Effect of antibiotics on the enzyme formation and its relation to the polyphenol biosynthesis. Agr.Biol.Chem.29, 1021-1026 (1965b).

MOHR, H.: The control of plant growth and development by light. Biol.Rev.39, 87-121 (1964).

MOHR, H.: Untersuchungen zur phytochrominduzierten Photomorphogenese des Senfkeimlings (Sinapis alba L.). Z.Pflanzenphysiol.54, 63-83 (1966).

MOHR, H. und G.SCHOSER: Eine Interferenzfilter-Monochromatoranlage für photobiologische Zwecke. Planta 53, 1-17 (1959).

MOHR, H. und E.PINNING: Der Einfluß des Lichtes auf die Bildung von Blattprimordien am Vegetationskegel der Keimlinge von Sinapis alba L. Planta 58, 569-578 (1962).

MOHR, H. und E.van NES: Der Einfluß sichtbarer Strahlung auf die Flavonoid-Synthese und Morphogenese der Buchweizenkeimlinge (Fagopyrum esculentum Moench). I.Synthese von Anthocyan. Z.Bot.51, 1-16 (1963).

RAU, W.: Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese.I. Das Wirkungsspektrum von Fusarium aquaeductuum. Planta 72, 14-28 (1967a).

RAU, W.: Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. II. Ersatz der Lichtinduktion durch Mercuribenzoat. Planta im Druck (1967b).

REINERT, J., H.CLAUSS und R.v.ARDENNE: Anthocyanbildung in Gewebekulturen von Haplopappus gracilis in Licht verschiedener Qualität. Naturwiss.51, 87 (1964).

RILLING, H.C.: Photoinduction of carotenoid synthesis of a Mycobacterium sp. Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 6o, 548-556 (1962).

SIEGELMAN, H.W.: Physiological studies on phenolic biosynthesis. In: Biochemistry of phenolic compounds, J.B. Harborne, ed., S.437-456, Academic Press London and New York 1964.

SCHERF, H., and M.H.ZENK: Induction of anthocyanin and phenylalanine ammonia-lyase formation by a high energy light reaction and its control through the phytochrome system. Z.Pflanzenphysiol.56, 2o3-2o6 (1967).

SCHMITT, J.H. und M.H.ZENK: Resolution of labelled DL-amino acids into their optical antipods by enzymatic acylation. Second international conference on methods of preparing and storing labelled compounds. Euratom Press, Brüssel, im Druck (1967).

SCHRAUDOLF, H. und F.BERGMAN: Der Stoffwechsel von Indolderivaten in Sinapis alba L. II. Untersuchungen zur Biogenese und Umsetzung von Indolglucosinolaten mit Hilfe von ringmarkiertem C^{14}-Tryptophan und S^{35}-Sulfat. Planta 67, 75-95 (1965).

STAFFORD, H.A.: Regulatory mechanisms in anthocyanin biosynthesis in first internodes of Sorghum vulgare: effect of presumed inhibitors of protein synthesis. Plant Physiol. 41, 953-961 (1966).

STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962.

THIMANN, K.V., and B.S.RADNER: The biogenesis of anthocyanins. V. Evidence for the mediation of pyrimidines in anthocyanin synthesis. Arch.Biochem.Biophys.59, 511-522 (1955).

THIMANN, K.V., and B.S.RADNER: The biogenesis of anthocyanin. VI. The role of riboflavine. Arch.Biochem. Biophys.74, 2o9-223 (1958).

THIMANN, K.V., and B.S.RADNER: The biogenesis of anthocyanin. VII. Requirement for both purines and pyrimidines. Arch.Biochem.Biophys. 96, 27o-279 (1962).

TROYER, J.R.: Quantitative changes in buckwheat flavonoid substances during seedling development. Plant Physiol.31, 75-78 (1956).

TROYER, J.R.: Leucoanthocyanin formation in buckwheat seedling hypocotyls. Phytochem.3, 535-539 (1964).

TROYER, J.R.: The distribution of rutin and other flavonoid substances in buckwheat seedlings. Plant Physiol. 3o, 168-173 (1955).

UDENFRIEND, S., and R.E.PETERSON: Tryptophan. In: Methods in Enzymology III, S.613-614, Academic Press Inc., New York 1957.

VINCE, D., and R.GRILL: The photoreceptors involved in anthocyanin synthesis. Photochem.Photobiol.5, 4o7-411 (1966).

WUNDERLICH, A.: Über das Fagopyrum-Rutin. Arch.Pharm.246, 241-256 (19o8).

ZENK, M.H.: Aufnahme und Stoffwechsel von α-Naphthyl-Essigsäure durch Erbsenepicotyle. Planta 58, 75-94 (1962).

ZENK, M.H.: Biosynthesis of C_6-C_1 compounds. In: Biosynthesis of aromatic compounds, G.Billek, ed., S.45-6o, Pergamon Press Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Paris, Braunschweig 1966.

ZENK, M.H. und H.SCHERF: D-Tryptophan in höheren Pflanzen. Biochem.Biophys.Acta (Amst.) 71, 737-738 (1963).

ZENK, M.H. und J.H.SCHMITT: Reinigung und Eigenschaften von Acetyl-CoA : D-Aminosäure-α-N-Acetyltransferase aus Hefe. Biochem.Z.342, 54-65 (1965).

ZUCKER, M.: The influence of light on synthesis of protein and of chlorogenic acid in potato tuber tissue. Plant Physiol. 38, 575-58o (1963).

ZUCKER, M.: Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiol.4o, 779-784 (1965).

ZUCKER, M., and J.F.AHRENS: Quantitative assay of chlorogenic acid and its pattern of distribution within tobaco leaves. Plant Physiol. 33, 246-249 (1958).

Herr Privatdozent Dr.M.H. Zenk überließ mir freundlicherweise das Thema, wofür ich ihm herzlich danken möchte. Mein ganz besonderer Dank gilt seinen vielen Anregungen und Ratschlägen, seiner großen Hilfsbereitschaft und seiner stets gezeigten Anteilnahme an allen wissenschaftlichen und persönlichen Fragen.

Herrn Professor Dr.L. Brauner danke ich sehr für sein freundliches Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Erteilung der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an seinem Institut.

Herrn Privatdozent Dr.W. Rau verdanke ich viele fruchtbare Diskussionen. Für das große Entgegenkommen, das ich stets von ihm erfahren habe, möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen.

L e b e n s l a u f

Am 13. März 1937 wurde ich, Helmut Scherf, als drittes Kind des damaligen Studienassesors, späteren Studiendirektors Dr. Andreas Scherf und seiner Ehefrau Martha, geborene Eller, in Aschaffenburg geboren. Vom Jahre 1943 bis Kriegsende besuchte ich die Volksschule in Salzburg. Nach der Ausweisung aus Österreich zogen wir, meine Mutter, meine fünf Geschwister und ich nach Berchtesgaden, wo ich weiter die Volksschule besuchte. Mein Vater starb 1945 in jugoslawischer Kriegsgefangenschaft. 1948 trat ich in die Oberrealschule in Bad Reichenhall ein und legte 1957 an dieser Schule die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1957/58 immatrikulierte ich mich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. Zunächst widmete ich mich bevorzugt der Fachrichtung Geologie, dann, nachdem ich im Wintersemester 1959/6o das Geologen-Vordiplom abgelegt hatte, den Fächern Biologie, Chemie und Geographie. 1965 bestand ich das Staatsexamen für das Lehramt an höheren Schulen. Im Botanischen Institut der Universität München begann ich 1963 unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr.M.H.Zenk mit der vorliegenden Arbeit. Am gleichen Institut war ich im Jahre 1962 und 1963 als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt, in den Jahren 1964 bis Nov. 1966 hatte ich die Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle inne. Seit Dezember 1966 bin ich Studienreferendar am Max Planck Gymnasium in München-Pasing. Seit 1966 bin ich verheiratet.